UNTERSUCHUNGEN ZUR ANALYTIK, BIOTRANSFORMATION, ENTZÜNDUNGSPHARMAKOLOGIE UND PHARMAKOKINETIK DES ISOPROPYLAMINOPHENAZON (ISOPYRIN®) UNTER VERGLEICHENDER BERÜCKSICHTIGUNG ANDERER AUSGEWÄHLTER PYRAZOLINONDERIVATE

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
im
Fachbereich Pharmazie
der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

GABRIELA RUCH-ZASKE
aus Berlin

Berlin 1985

UNIV. LIBRARY

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547201_0049

UNTERSUCHUNGEN ZUR ANALYTIK, BIOTRANSFORMATION, ENTZÜNDUNGSPHARMAKOLOGIE UND PHARMAKOKINETIK DES ISOPROPYLAMINOPHENAZON (ISOPYRIN ®) UNTER VERGLEICHENDER BERÜCKSICHTIGUNG ANDERER AUSGEWÄHLTER PYRAZOLINONDERIVATE

INAUGURAL - DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
im
Fachbereich Pharmazie
der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

GABRIELA RUCH - ZASKE

aus Berlin

Berlin 1985

1. Gutachter: Prof.Dr. K.-H. Beyer

2. Gutachter: Prof.Dr. P. Nickel

Tag der mündlichen Prüfung: 21.06.1985

Wissen nennen wir jenen kleinen Teil
der Unwissenheit, den wir geordnet
und klassifiziert haben.

(A. Bierce)

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin auf Anregung und unter Leitung von

Herrn Prof. Dr. Karl-Heinz Beyer

durchgeführt.

Für seine Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit danke ich Herrn Prof. Dr. K.-H. Beyer sehr herzlich.

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG 1

II. LITERATURÜBERSICHT 4

1. Analytik, Pharmakokinetik und Biotransformation des Isopropylaminophenazon (5) 4
2. Biotransformation anderer Pyrazolinone 6
3. Pharmakologie 10

III. ERGEBNISSE 14

1. Metabolismus des Isopropylaminophenazon (5) 14
   1.1. DC/MS/^{1}H-NMR-Screening 14
      1.1.1. DC-Untersuchungen 14
      1.1.2. DC/MS-Untersuchungen 17
      1.1.3. DC/^{1}H-NMR-Untersuchungen 35
      1.1.4. Wertende Zusammenfassung der Ergebnisse des Metabolitenscreening nach DC-Trennung 37
   1.2. Massenspektrometrische Untersuchungen von Metabolitengemischen durch fraktionierte Verdampfung 39
   1.3. Untersuchungen von Metabolitengemischen durch FAB-Massenspektrometrie 53
   1.4. Zusammenfassung der Ergebnisse 56
2. Metabolismus anderer Pyrazolinone 58
   2.1. Untersuchungen von Metabolitengemischen des Phenazon (1) durch fraktionierte Verdampfung 59
   2.2. Untersuchungen von Metabolitengemischen des Noramidopyrinmethansulfonat-Na (4) durch fraktionierte Verdampfung 61
   2.3. Untersuchungen von Metabolitengemischen des Dimethylaminophenazon (3) durch fraktionierte Verdampfung 63
   2.4. Wertende Zusammenfassung 67

Seite

3. Untersuchungen zur Bildung von Rubazonsäure (26) und Methylrubazonsäure (27) 69

4. Analytik und Pharmakokinetik des Isopropylaminophenazon (5) und ausgewählter Biotransformationsprodukte 77

4.1. Analytik des Isopropylaminophenazon (5) 77

4.1.1. GC-Analytik des Isopropylaminophenazon (5) 78

4.1.2. Extraktionsverfahren für Isopropylaminophenazon (5) aus biologischem Material 81

4.1.3. HPLC-Analyse des Isopropylaminophenazon (5) 82

4.2. Analytik ausgewählter Biotransformationsprodukte von 5 82

4.2.1. GC-Analyse ausgewählter Biotransformationsprodukte 83

4.2.2. HPLC-Analyse des Isopropylaminophenazon (5) und ausgewählter Biotransformationsprodukte 84

4.2.3. HPLC-Analyse biologischer Proben 87

4.3. Untersuchungen zur Pharmakokinetik des Isopropylaminophenazon (5) beim Menschen 88

4.3.1. Pharmakokinetik des Isopropylaminophenazon (5) in Plasma, Speichel und Urin 89

4.3.2. Pharmakokinetik ausgewählter Biotransforamtionsprodukte des Isopropylaminophenazon (5) in Plasma und Urin 91

4.4. Vergleich pharmakokinetischer Parameter von Isopropylaminophenazon (5), Dimethylaminophenazon (3), Noramidopyrinmethansulfonat-Na und Phenazon (1) 94

Seite

5. Untersuchungen zum entzündungspharmakologischen Effekt von Isopropylaminophenazon (5) 97
5.1. Hemmung der Bildung von Prostaglandinen 97
5.2. Entzündungshemmung von Isopropylaminophenazon (5) und Hydroxyphenazon (8) am Modell des provozierten Rattenpfotenödems 99
5.3. Reaktion von Singulett-Sauerstoff mit Isopropylaminophenazon (5) 101

IV. ZUSAMMENFASSUNG 115

V. EXPERIMENTELLER TEIL 119

1. Meßgeräte und analytische Methoden 119
2. Chemikalien 125
3. Probengewinnung 126
4. Aufarbeitung von Harnproben zur Isolierung und Identifizierung von 5 und seinen Metaboliten 127
5. Identifizierung von Rubazonsäure (26) und Methylrubazonsäure (27) in Harnen nach Einnahme von Dimethylaminophenazon (3), Noramidopyrinmethansulfonat-Na (4) bzw. Isopropylaminophenazon (5) 130
6. Allgemeine gaschromatographische Untersuchungen 130
7. Bioanalytische Verfahren 131
8. Berechnung pharmakokinetischer Parameter 134
9. In-vitro-Untersuchungen zur Hemmung der Prostaglandinsynthase 137
10. Hemmung des Carrageenin-induzierten Rattenpfotenödems 137
11. Umsetzung von 5 mit Singulett-Sauerstoff 138
12. Referenzsubstanzen 140

Anhang 146

VI. LITERATURVERZEICHNIS 147

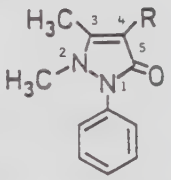
Lebenslauf

I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Im Jahre 1883 synthetisierte Knorr mit Phenazon (1) den ersten Vertreter der Pyrazolinone, einer Substanzklasse schwach wirksamer Analgetika mit antipyretischer und antiphlogistischer Wirkung.

Im Verlauf der weiteren Entwicklung gelangte man durch Variationen der Substitution in der C-4-Position des Heterocyclus zu pharmakologisch aktiveren bzw. besser wasserlöslichen Verbindungen (Propyphenazon (2), Dimethylaminophenazon (3) bzw. Noramidopyrinmethansulfonat-Natrium (4)).

Nr.	R	Kurzbezeichnung*
1	-H	Phenazon (INN)
2	$-CH<^{CH_3}_{CH_3}$	Propyphenazon (INN)
3	$-N<^{CH_3}_{CH_3}$	Dimethylaminophenazon
4	$-N<^{CH_2-SO_3Na}_{CH_3}$	Noramidopyrinmethan-sulfonat-Natrium (INN)
5	$-NH-CH<^{CH_3}_{CH_3}$	Isopropylaminophenazon



* In der vorliegenden Arbeit wird der INN Aminophenazon für Dimethylaminophenazon (3) nicht verwendet, um eine eindeutige Benennung aller auftretenden Pyrazolinonstrukturen zu gewährleisten; Aminophenazon bezeichnet die Verbindung 6 (R: $-NH_2$) (vgl. S. 8 f.).

Abb. 1: 1-Phenyl-2,3-dimethyl-3-pyrazolin-5-on-Derivate

Das 4-N-Isopropylaminoderivat des Phenazon besitzt ähnliche antiinflammatorische und antipyretische Eigenschaften wie Dimethylaminophenazon (3), zeigt jedoch, im Gegensatz zu den anderen therapeutisch eingesetzten Pyrazolinonen, zentral dämpfende Effekte. Auf dem deutschen Arzneimittelmarkt wird Isopropylaminophenazon (Isopyrin®) (5) nur noch in Verbindung mit Phenylbutazon als Handelspräparat TOMANOL® (Byk Gulden, Konstanz) zur Therapie der Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises eingesetzt. Phenylbutazon weist, verglichen mit den Pyrazolinonen, nur geringe analgetische, jedoch ausgeprägte antiphlogistische Wirkung auf. Als Mechanismus der Entzündungshemmung wird allgemein eine Beeinflussung der Prostaglandinsynthese diskutiert.

Nach dem Verbot der Anwendung des Dimethylaminophenazon (3) aufgrund der Gefahr der Nitrosaminbildung[1)] wurde den Nebenwirkungen der Pyrazolinone vermehrt Bedeutung beigemessen. Insbesondere bei den 4-Amino-Derivaten scheint das Risiko einer allergischen Reaktion (anaphylaktischer Schock) deutlich erhöht[2)]. Die Hypothese, daß ein Biotransformationsprodukt auslösender Faktor dieser Nebenwirkung sein könnte, warf die Frage nach der Metabolisierung dieser Pharmaka erneut auf[67)].

Im Falle des Isopropylaminophenazon (5) lagen zur Biotransformation bisher ausschließlich tierexperimentelle Befunde (Ratte) vor, wobei nur annähernd 3% der applizierten Dosis als unveränderter Wirkstoff (5), Aminophenazon (6) und Acetylaminophenazon (7) im Harn wiedergefunden werden konnten[3)].

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es:

1.) eingehende Studien zum Metabolismus des Isopropylaminophenazon (5) beim Menschen vorzunehmen (Isolierung und Identifizierung von Biotransformationsprodukten),

2.) neue Möglichkeiten der Strukturaufklärung, insbesondere der Massenspektrometrie, auf die Anwendbarkeit zur Identifizierung von Arzneistoffen, ihrer Metaboliten sowie intakter Konjugate am Beispiel ausgewählter Pyrazolinonderivate zu testen,

3.) quantitative Bestimmungen des Isopropylaminophenazon (5) bzw. einiger Biotransformationsprodukte in Serum und Harn mit Hilfe moderner chromatographischer Verfahren (GC,HPLC) durchzuführen und

4.) an ausgewählten Modellen den Arzneistoff Isopyrin® (5) entzündungspharmakologisch zu charakterisieren (Prostaglandinsynthase- und Entzündungshemmung, Reaktivität mit aktivierten Sauerstoffspezies).

II. LITERATURÜBERSICHT

1. ANALYTIK, PHARMAKOKINETIK UND BIOTRANSFORMATION DES ISOPROPYLAMINOPHENAZON (5)

Die einzigen detaillierten Untersuchungen zur Verteilung und Ausscheidung des Isopropylaminophenazon (5) wurden von Richarz et al. 1960 beschrieben[3]. Die Studie wurde tierexperimentell an der Ratte durchgeführt.

Die Arzneistoffkonzentration in Serum und Harn wurde nach Extraktion ($CHCl_3$) und Reextraktion (0.1 N HCl) UV-spektralphotometrisch bei 258 nm bestimmt. Isopropylaminophenazon (5) verteilte sich sowohl nach parenteraler als auch nach oraler Gabe schnell und weitgehend gleichmäßig in den wässrigen Kompartimenten der Körper der Versuchstiere. Nach i.v. und i.m. Injektion von 150 mg Wirkstoff/kg war 5 bis zu 10 h im Blut nachweisbar.

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der Verbindung 5 zu Dimethylaminophenazon (3) wurde vermutet, daß Aminophenazon (6) und Acetylaminophenazon (7) auch hier als Hauptabbauprodukte auftreten sollten, zu deren Quantifizierung die Emerson-Reaktion[4] - für das Acetylderivat nach Verseifung - herangezogen wurde. In Tab. 1 sind die im Verlauf von 48 h p.appl. renal eliminierten Dosisanteile nach i.m. Verabreichung von 150 mg 3 bzw. 5/kg vergleichend gegenübergestellt.

	Amino-phenazon (6)	Acetylamino-phenazon (7)	unveränd. Wirkstoff	renal elim. Dosisanteile
Isopropyl-aminophenazon (5)	0.3	1.6	1.5	3.4
Dimethyl-aminophenazon (3)	2.6	21.7	7.5	31.8
Einheit:	% der applizierten Dosis			

Tab. 1: Renal eliminierte Dosisanteile von 6, 7 und unverändertem Wirkstoff nach i.m. Applikation von 150 mg 5 bzw. 3/kg bei der Ratte (0-48 h p.appl.)

Darüber hinaus wurden nach säulenchromatographischer Trennung aus dem Harn farbige Produkte isoliert, von denen eines durch Vergleich der UV-Absorptionsspektren als Rubazonsäure (26) (s. S.69) identifiziert, jedoch nicht quantifiziert wurde. Der weitaus größte Anteil - mehr als 95% - der Biotransformationsprodukte des Isopropylaminophenazon (5) waren somit unbekannt.

Maurer und Pfleger[5)] beschrieben in einer 1983 erschienenen Veröffentlichung ein GC/MS-Verfahren zur qualitativen Erfassung schwacher Analgetika und ihrer Metaboliten (nach chemischer Derivatisierung!) aus Humanharn. Danach war die Identifizierung von 5 nur anhand des unveränderten Wirkstoffes und seines N-2-Norderivates (19) (s. S. 46), den einzigen aufgefundenen renalen Eliminationsformen der Verbindung 5, möglich. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den tierex-

perimentellen Daten, da eine Metabolisierung unter Abspaltung der Isopropylgruppe und somit auch eine prinzipielle Ähnlichkeit in der Biotransformation der substituierten 4-Aminopyrazolinone (primäre Desalkylierung, vgl. II.2.) negiert wurde[5]. Die aufgezeigten Unterschiede waren insofern von besonderem Interesse, als das Bundesgesundheitsamt[6] im Juli 1982 die Verschreibungspflicht parenteraler Arzneiformen von Noramidopyrinmethansulfonat-Na (Metamizol) (4) und Isopropylaminophenazon (5) folgendermaßen begründet hatte:

"Im Zusammenhang mit der Verabreichung von Isopyrin wurden Fälle von Schock und Schockfragmenten beobachtet. Der Metabolismus des Isopyrin entspricht nach vorliegenden Untersuchungen dem von Metamizol. Die derzeitigen Kenntnisse lassen annehmen, daß Isopyrin und Metamizol grundsätzlich ein gleichartiges Risiko haben."

2. BIOTRANSFORMATION ANDERER PYRAZOLINONE

Qualitative Unterschiede in der Metabolisierung lassen diesbezüglich eine Teilung der Pyrazolinone in zwei Gruppen zu[7]. Zusammengefaßt werden zum einen die in der 4-Position durch eine Aminogruppe substituierten Derivate wie Dimethylaminophenazon (3) und Noramidopyrinmethansulfonat-Na (4). Der Hauptabbauschritt besteht in der Desalkylierung der Aminogruppe. Im Gegensatz dazu werden Phenazon (1) und Propyphenazon (2) überwiegend durch oxidative Reaktionen (Hydroxylierungen) metabolisiert.
Die Biotransformation der oben genannten Verbindungen 1, 3 und 4 ist in den Abb. 2-4 dargestellt.

(In den folgenden Abbildungen wird auf die Darstellung identifizierter Glucuronsäure- und Sulfatkonjugate aus Gründen der Übersichtlichkeit bewußt verzichtet; ferner fehlen in den Metabolisierungsschemata der 4-Amino-pyrazolinone die isolierten dimeren Verbindungen wie Rubazon- und Methylrubazonsäure, da der Nachweis, ob es sich hierbei um "echte" Biotransformationsprodukte oder Artefakte handelt, bis heute nicht erbracht wurde.)

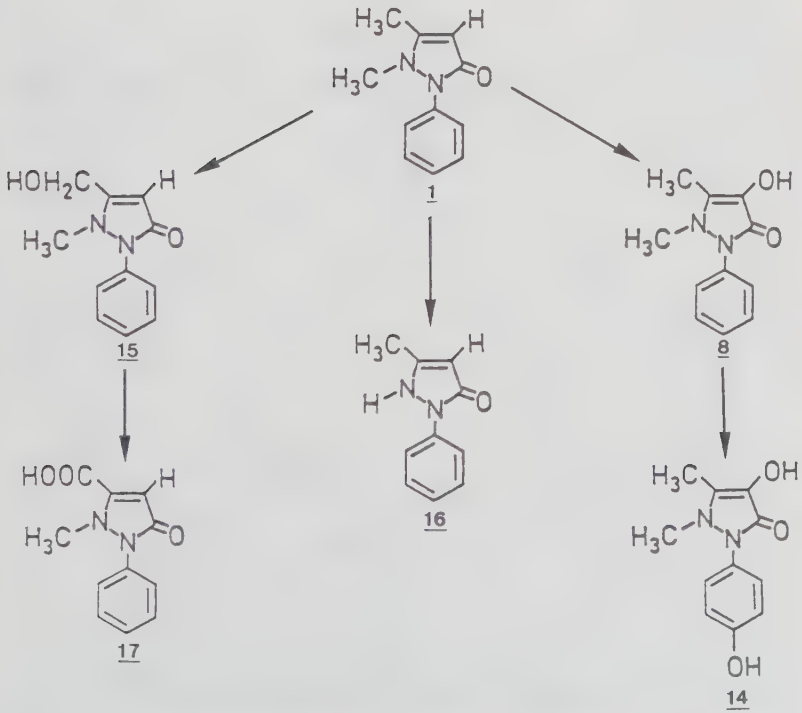


Abb. 2: Biotransformation des Phenazon (1)[8,9]

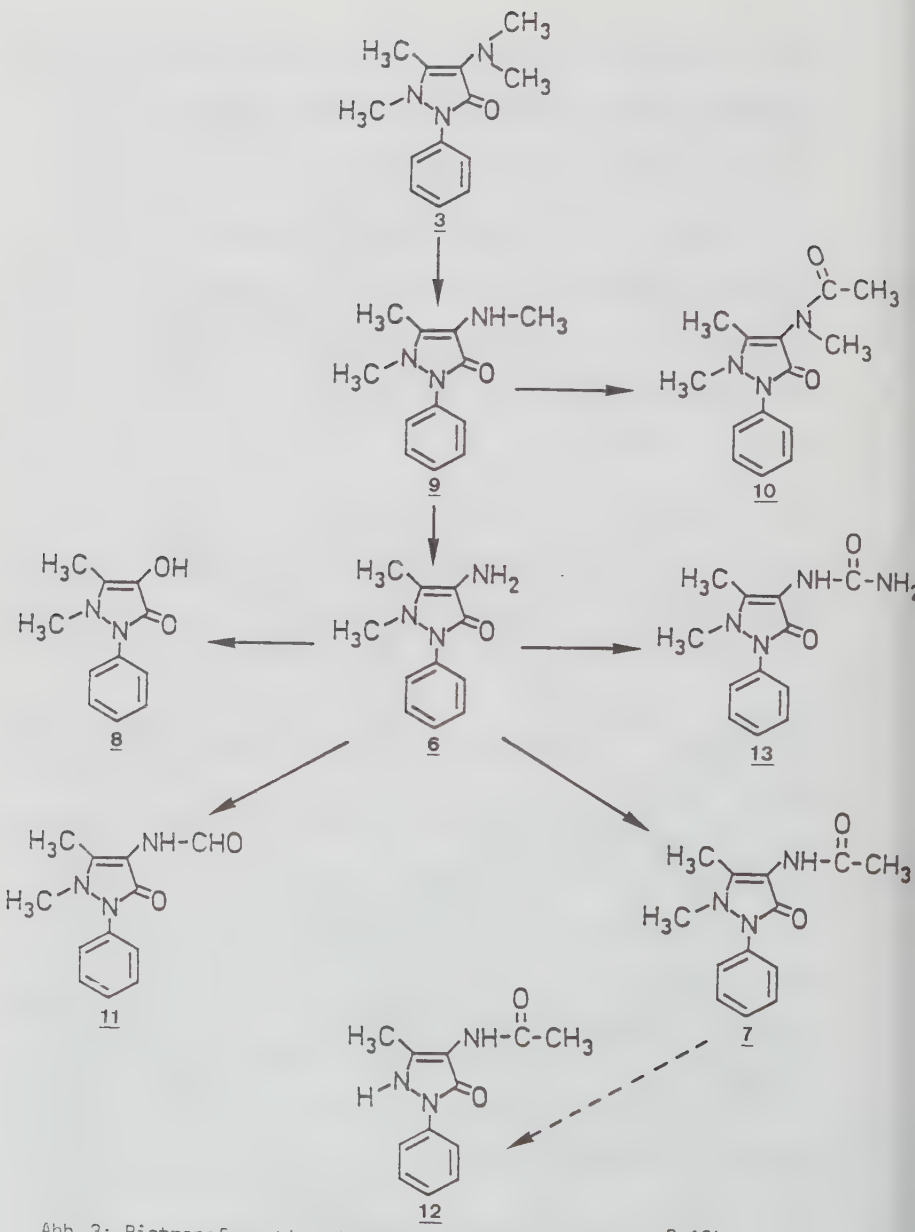


Abb. 3: Biotransformation des Dimethylaminophenazon (3)[9,10]

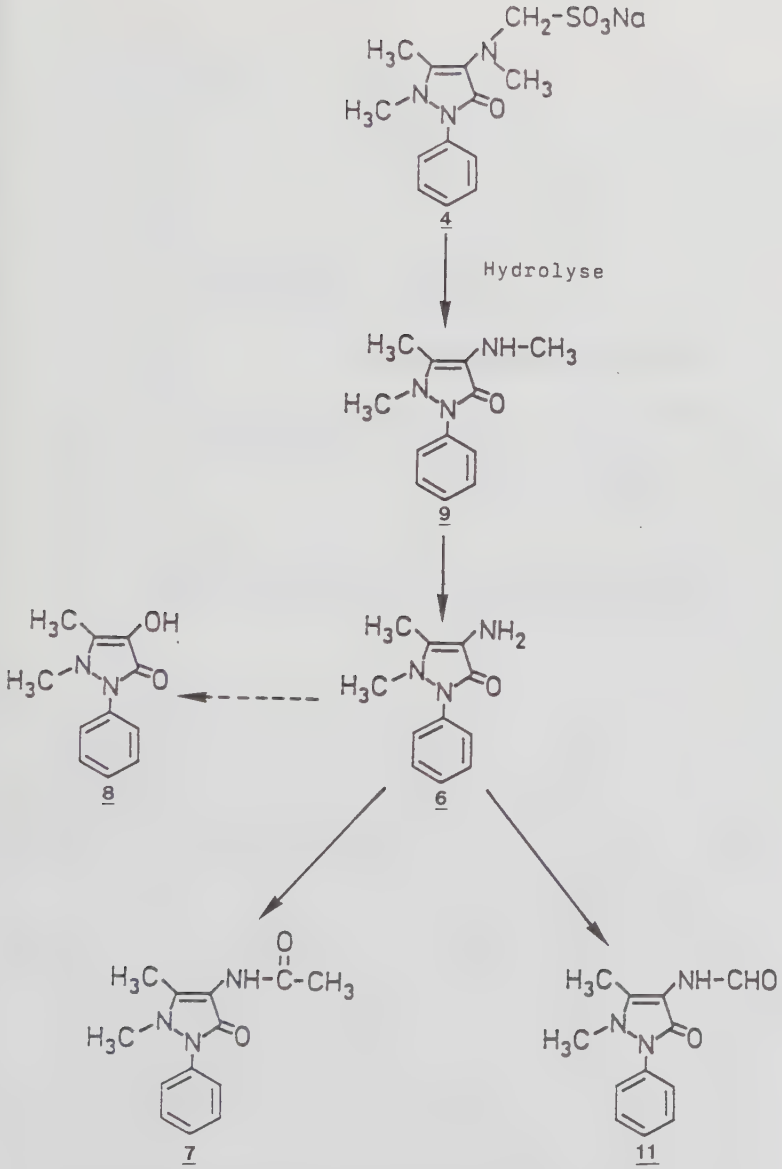


Abb. 4: Biotransformation des Noramidopyrinmethansulfonat-Natrium (4)[9,10]

3. PHARMAKOLOGIE

Isopropylaminophenazon (5) zeigt neben analgetischen, antipyretischen und antiphlogistischen Eigenschaften insbesondere einen zentral dämpfenden Effekt[11]. Kleinere Dosen wirken sedativ, höhere hypnotisch. Aufgrund dieser Eigenschaft nimmt 5 eine Sonderstellung unter den Arzneistoffen der Pyrazolinonreihe ein. Diese haben - genau wie die therapeutisch eingesetzten Pyrazolidinderivate (Phenylbutazon) - einen erregenden Einfluß auf das ZNS; hohe Dosen wirken konvulsiv. Eine Kombination von 5 mit Phenylbutazon erscheint insofern aus pharmakologischer Sicht sinnvoll, da der erregende bzw. konvulsive Einfluß des letzteren, der eine unerwünschte Nebenwirkung darstellt, durch 5 eingeschränkt oder aufgehoben wird.

Bezüglich der schmerzstillenden (Reaktionszeit nach thermischer Reizung des Mäuseschwanzes) wie auch der fiebersenkenden (Einfluß auf durch Lipopolysaccharide hervorgerufene Hyperthermie des Kaninchens) Wirkung bestehen zwischen Isopropylaminophenazon (5) und Dimethylaminophenazon (3) keine signifikanten Unterschiede[11].

Die antiphlogistischen Eigenschaften von 5 wurden u.a. an der Hemmung des Carrageenin-induzierten Ödems der Rattenhinterpfote gemessen[12]. Bei oraler Gabe niederer Dosen war die antiinflammatorische Wirkung geringer als bei Phenylbutazon. Nach Gabe von mehr als 100 mg/kg erhielt man vergleichbare antiphlogistische Effekte (s. Abb. 5).

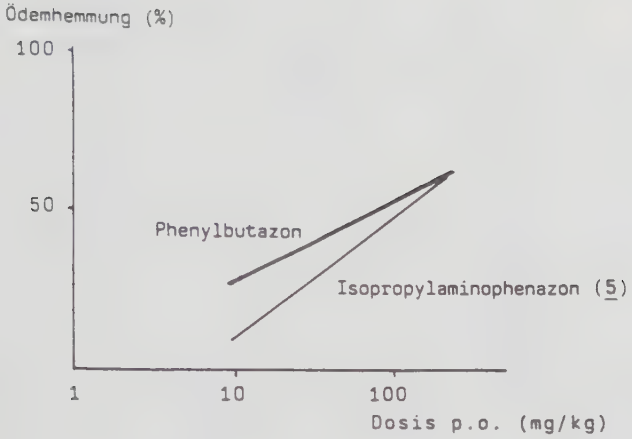


Abb. 5: Hemmung des Carrageeninödems der Rattenhinterpfote durch Phenylbutazon bzw. Isopropylaminophenazon (5)

Die entzündungshemmende Wirkung nicht steroidaler Antiphlogistika wird u.a. auf die Hemmung der Synthese der Prostaglandine, Thromboxane bzw. der Endoperoxide PGG_2 und PGH_2 als Zwischenprodukte dieser Synthese zurückgeführt[13-17], da diese Gewebshormone (neben anderen Mediatoren) maßgeblich am Entzündungsprozeß beteiligt sind. Prostaglandine und Thromboxane sind neben Prostacyclinen Metabolisierungsprodukte dér Arachidonsäure, die im Rahmen des Cyclooxygenaseweges gebildet werden (s. Abb. 6). In vitro kann eine Inhibition der Prostaglandinbildung unter Verwendung von Enzympräparationen (z.B. aus dem Nierenmark der Ratte[18]) untersucht werden.

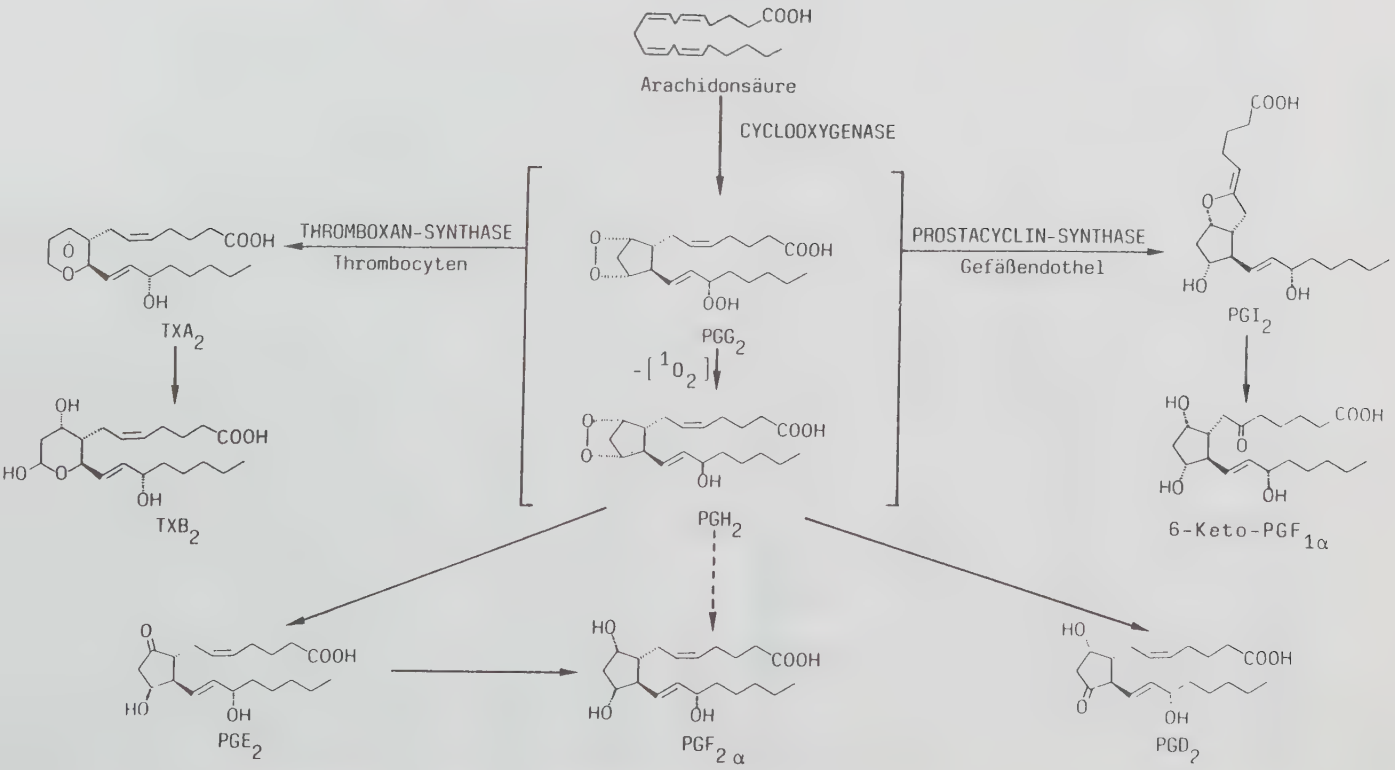


Abb. 6: Cyclooxygenaseweg der Arachidonsäurekaskade

Ferner wird über die Bedeutung von aktiviertem Sauerstoff im Entzündungsgeschehen diskutiert[68], der bei der Bildung von PGH_2 aus PGG_2 entsteht. Reaktive Sauerstoffspezies können die Funktionsfähigkeit von Proteinen erheblich beeinträchtigen und somit den Entzündungsprozeß fördern. Sollte ein Pharmakon mit diesem Sauerstoff reagieren, könnte über einen Abfangmechanismus die Antiphlogese erklärt werden. Cadenas[19] konnte zeigen, daß beim Zerfall von PGG_2 zu PGH_2 Singulett-Sauerstoff ($^1O_2$) freigesetzt wird. Reaktionen dieses Sauerstofftyps mit antiinflammatorisch wirkenden Pharmaka (z.B. Indometacin) sind beschrieben[20].
Über die Natur des zur Bildung von PGG_2 benötigten Sauerstoffs liegen bislang keine fundierten Kenntnisse vor. Es sollte sich jedoch auch hier um aktivierte Sauerstoffspezies ($\dot{O}_2^-$-Radikale, $\dot{O}H$-Radikale, H_2O_2 oder $^1O_2$) handeln.

III. ERGEBNISSE

1. METABOLISMUS DES ISOPROPYLAMINOPHENAZON (5)

1.1. DC/MS/^{1}H-NMR-Screening

1.1.1. DC-Untersuchungen

Nach peroraler Applikation von 1 g Isopropylaminophenazon (5) wurde der Harn in zwei Fraktionen (0-12h und 12-24h p.appl.) gesammelt. Vor der Medikation wurde entsprechend ein Leerharn gewonnen.

Für die dünnschichtchromatographische Untersuchung standen

- Isopropylaminophenazon (5),
- Aminophenazon (6),
- Acetylaminophenazon (7) und
- Hydroxyphenazon (8)

als Referenzsubstanzen zur Verfügung.

Die Extraktion des Harns erfolgte 1.) ohne weitere Vorbehandlung (Direktextraktion, s. S. 127f.) und 2.) nach enzymatischer Spaltung durch ß-Glucuronidase/Arylsulfatase (s. S. 128) mit Chloroform. Leerharnproben wurden unter gleichen Bedingungen aufgearbeitet und dienten zu Vergleichszwecken der Erkennung physiologischer Begleitsubstanzen. Mit Diethylether wurden im Vergleich zu Chloroform zwar weniger störende Matrixbestandteile eluiert, jedoch war mit diesem Lösungsmittel der von Richarz et al.[3] aufgrund

tierexperimenteller Befunde geforderte Metabolit 7 des Isopropylaminophenazon (5) nur unzureichend extrahierbar. Der dünnschichtchromatographische Vergleich ergab darüber hinaus keinen Anhaltspunkt für das Auftreten von Biotransformationsprodukten, die zwar mit Diethylether, nicht aber mit Chloroform zu extrahieren waren.

Nach direkter Extraktion des 12h-Sammelurins wies das Chromatogramm (s. Abb. 7) Substanzen auf, deren Rf-Werte denen von Isopropylaminophenazon (5), Aminophenazon (6) und Acetylaminophenazon (7) entsprachen. Es wurde jedoch beobachtet, daß der Metabolit 6 selbst bei optimalen Extraktionsbedingungen (pH 9) nicht in allen untersuchten Proben (n = 12) aufgefunden werden konnte. Interindividuelle pharmakogenetische Unterschiede in der Acetylierungsrate (Metabolisierung von 6 zu 7) könnten ein Grund für den schwankenden Gehalt an 6 sein.

Die Auszüge nach enzymatischer Spaltung zeigten im Vergleich zu direkt extrahierten Proben zusätzlich zwei Flecke, von denen einer in seiner Laufhöhe dem Hydroxyphenazon (8) entsprach. Darüber hinaus traten zwei farbige, vermutlich weniger polare Verbindungen auf, die bereits von Richarz et al.[3] beschrieben worden waren. Wurden Harnproben, in denen Aminophenazon (6) nach Direktextraktion nachweisbar war, zuerst enzymatisch hydrolysiert und anschließend mit Chloroform eluiert, konnte 6 in keinem Fall mehr nachgewiesen werden. Somit lag die Vermutung nahe, daß 6 maßgeblich an der Bildung der farbigen, nur nach Hydrolyse auftretenden Pro-

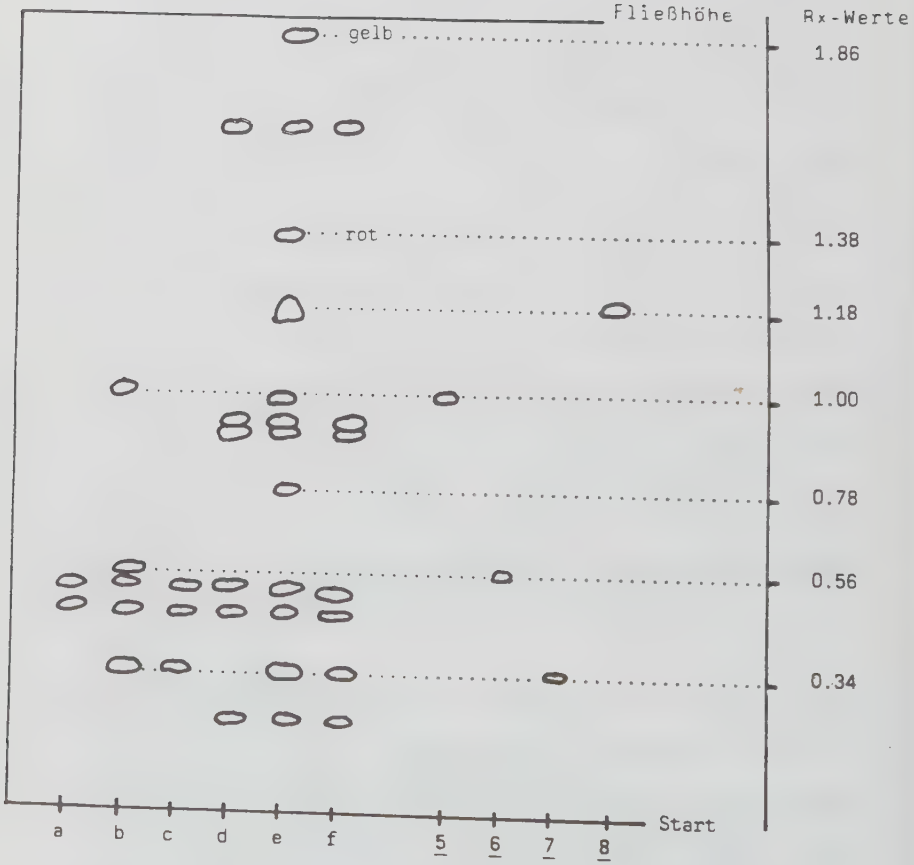


Abb. 7: Dünnschichtchromatogramm des Metabolitenscreening
(Fließmittel: $CHCl_3/Et_2O/MeOH$ (70/30/10) (v/v/v), Detektion: 254 nm)

a: Leerharn (Direktextrakt)
b: Harn 1-12 h p.appl. (Direktextrakt)
c: Harn 12-24 h p.appl. (Direktextrakt)
d: Leerharn (nach enzymatischer Spaltung)
e: Harn 1-12 h p.appl. (nach enzymatischer Spaltung)
f: Harn 12-24 h p.appl. (nach enzymatischer Spaltung)

5: Isopropylaminophenazon
6: Aminophenazon
7: Acetylaminophenazon
8: Hydroxyphenazon

Die R_x-Werte wurden bezogen auf Isopropylaminophenazon (5) = 1.00

dukte (Artefakte?) beteiligt gewesen sein könnte.
Im Verlauf der weiteren Ausscheidung (12-24h) konnte im Dünnschichtchromatogramm nur noch der Metabolit 7 aufgefunden werden.
Die analytische DC ergab somit Hinweise für das Vorliegen von Isopropylaminophenazon (5), Aminophenazon (6), Acetylaminophenazon (7), Hydroxyphenazon (8) und einiger strukturell ungeklärter, z.T. farbiger Verbindungen als renaler Exkretionsprodukte des untersuchten Pharmakons.
Zur eindeutigen Identifizierung der postulierten Metaboliten und zur Strukturaufklärung der weiteren mutmaßlichen Abbauprodukte wurden die Substanzen mit Hilfe der präparativen DC konzentriert und nach Elution der entsprechenden Zonen (s. S. 128) der MS- und ^{1}H-NMR-Analyse unterworfen.

1.1.2. DC/MS-Untersuchungen

Die Analyse der dünnschichtchromatographisch angereicherten Verbindungen erfolgte massenspektrometrisch unter Anwendung der Elektronenstoßionisation (EI). Das Vorliegen von Molekülionen wurde durch chemische Ionisation (CI) bestätigt.
Das beschriebene Aufarbeitungsverfahren (s.S. 127f.) gewährleistet nicht in jedem Fall die Isolierung verunreinigungsfreier Verbindungen. Dadurch wird - insbesondere wenn keine Referenzsubstanzen vorliegen - die Interpretation der EI-

Spektren, die die Summe der Zerfälle aller Molekül- und Fragmentionen darstellen, erschwert. Verwendet man jedoch zusätzlich die MS/MS-Technik (s. S. 120) können die durch Begleitsubstanzen bedingten Störungen umgangen und charakteristische Zerfälle dem Molekülion sicher zugeordnet werden. Bei dieser Methode werden die außerhalb der Ionenquelle auftretenden Fragmentierungen eines bestimmten Ions registriert (Metastabilen-Scan). Die relativen Intensitäten der Ionen in EI- und MS/MS-Spektren sind somit nicht in jedem Fall vergleichbar.
In dieser Arbeit werden die für die Struktur der Komponenten signifikanten Zerfälle der Molekülionen beschrieben. Die elementare Zusammensetzung von Molekül- und Fragmentionen wurde durch exakte Massenbestimmung (Hochauflösung) gesichert.

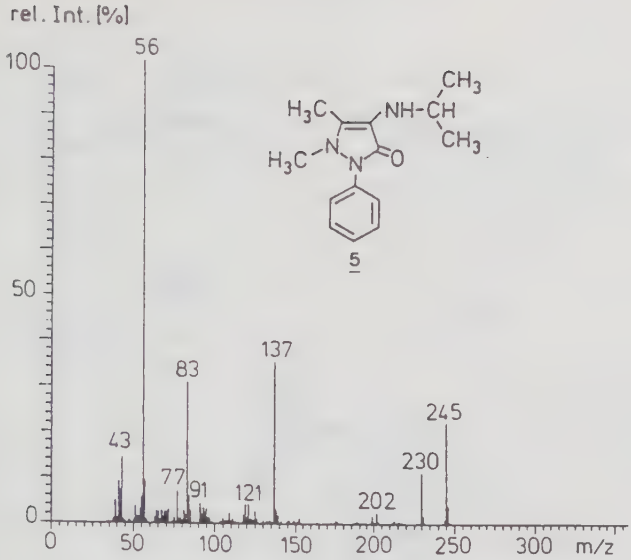
a) MS-Untersuchungen der Zone $R_x = 1$ (vgl. S. 16)

Die auf Seite 19 abgebildeten massenspektrometrischen Daten dieser Zone waren mit denen der Referenzsubstanz Isopropylaminophenazon (5) identisch.

Interpretation:

Das Molekülion ($M^{+\cdot}$) wird repräsentiert durch m/z 245 ($C_{14}H_{19}N_3O$). Durch Abspaltung einer Methylgruppe erhält man m/z 230. Der Verlust der Isopropylgruppe aus $M^{+\cdot}$ führt zur Bildung des Fragmentes m/z 202. Das Ion m/z 125 erhält man

a)



5

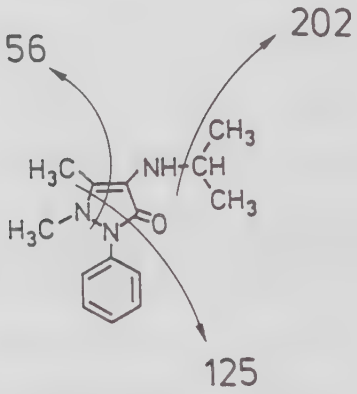
b)

M^+ (m/z 245)
$C_{14}H_{19}N_3O$

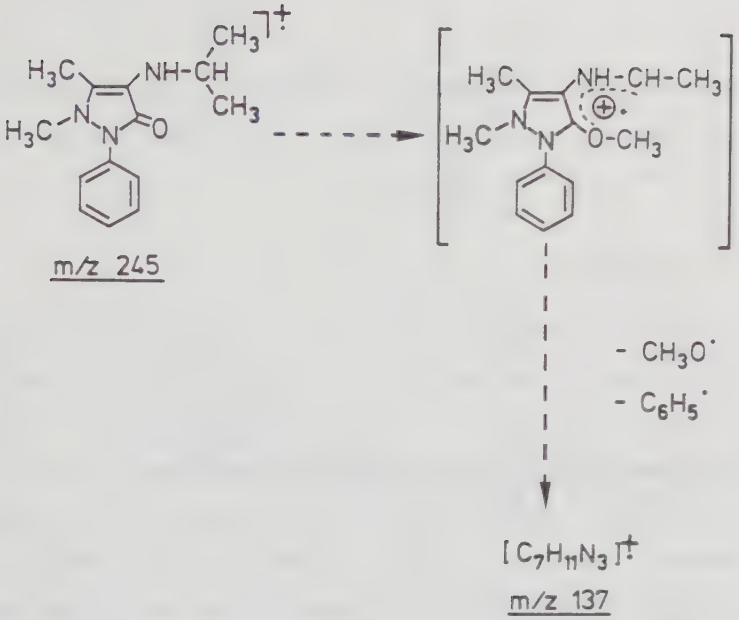
Fragment m/z	Summenformel nach Hochauflösung	Intensität [%] (Σ Zerfälle = 100%)
230	$C_{13}H_{16}N_3O$	11.0
216	$C_{13}H_{18}N_3$	5.9
202	$C_{11}H_{12}N_3O$	41.8
189	$C_{11}H_{13}N_2O$	0.6
175	$C_{10}H_{11}N_2O$	0.4
154	$C_8H_{14}N_2O$	7.7
137	$C_7H_{11}N_3$	26.5
125	$C_7H_{11}NO$	5.5
111		0.1
95		0.2
83	C_4H_5NO	0.1
56	C_3H_6N	0.2

Abb. 8: MS-Daten des Isopropylaminophenazon (5)
a) EI-Spektrum (180° C, 80 eV)
b) Fragmentierung des Molekülradikalions (MS/MS-Technik)

aus $M^{+\cdot}$ nach Eliminierung der (N-1-Phenyl-N-2- methylhydrazin)-Partialstruktur des Isopropylaminophenazon (5).



Die Bildung von m/z 137 ($C_7H_{11}N_3$) setzt eine Umlagerung des Molekülions voraus, bei der offenbar eine Methylgruppe des Isopropylrestes zum sterisch begünstigten Pyrazolinon-sauerstoff wandert. Diesem Primärschritt folgt die spontane Abgabe von $OCH_3^{\cdot}$- und $C_6H_5^{\cdot}$-Radikalen. Da das Ion m/z 137 bei anderen untersuchten Pyrazolinonderivaten nicht auftrat, bildet es ein für Isopropylaminophenazon (5) charakteristisches Fragment.



Im vorliegenden EI-Spektrum (s. S. 19) treten $[C_3H_6N]^+$-Ionen (m/z 56) mit hoher relativer Intensität (base peak) auf. Die direkte Abspaltung dieses Fragmentes aus $M^{+\cdot}$ (unter Bildung von m/z 189) charakterisiert die N-2,C-3-dimethylierte Teilstruktur des Isopropylaminophenazon (5) (rel. Int. im MS/MS-Spektrum 0.2%). Das hohe Ausmaß des Auftretens von m/z 56 im EI-Spektrum - im Gegensatz zum MS/MS-Spektrum - resultiert aus sekundären Zerfällen gebildeter Fragmentionen (vgl. S. 19).

Das Auftreten von $[C_3H_6N]^+$-Ionen konnte auch in den EI- und MS/MS-Spektren anderer partialstrukturanaloger Pyrazolinone gefunden werden und scheint somit für die N-2,C-3-Dimethylsubstitution beweisend zu sein (vgl. hierzu auch Spiteller[21]

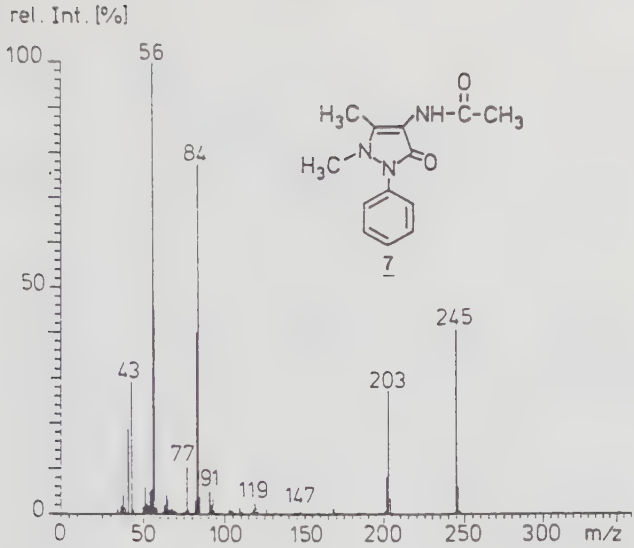
b) MS-Untersuchungen der Zone $R_x = 0.34$ (vgl. S. 16)

Die auf Seite 23 abgebildeten MS-Daten dieser Zone waren mit denen der präparativ dargestellten Referenzsubstanz Acetylaminophenazon (7) identisch.

Interpretation:

Das Acetylaminophenazon (7) bildet, bedingt durch die als Schutzgruppe fungierende CH_3-CO-Substitution, ein stabiles Molekülradikalion der Masse m/z 245 ($C_{13}H_{15}N_3O_2$). Die für acetylierte Verbindungen typische Keten-Abspaltung führt zu m/z 203. (Im MS/MS-Spektrum tritt dieses Ion mit überragender Intensität - 95% aller Zerfälle - auf. Daher wurde bei der Darstellung der Fragmentierung von M^+ der prozentuale Anteil dieses Peaks nicht berücksichtigt und die Summe aller anderen Peaks auf 100% normiert.)
Das Ion m/z 203, das formal dem Aminophenazon (6) entspricht, geht unter Abspaltung von Phenylisocyanat (ΔU 119) in m/z 84 über. Auch die Umkehrung dieser Fragmentierungsfolge wird beobachtet: Initiale Eliminierung von ΔU 119 unter Bildung des Fragmentes m/z 126, welches unter Keten-Abspaltung wiederum m/z 84 bildet (s. Abb. 10, S. 24). Diese verschiedenen Entstehungsmöglichkeiten des Ions m/z 84 führen zu der hohen relativen Intensität dieses Peaks (73%) im EI-Spektrum (s. Abb. 9).
Die N-2,C-3-Dimethylsubstitution wird auch in diesem Fall durch m/z 56 charakterisiert (vgl. auch S. 21).

a)



7

b)

M^+ (m/z 245)
$C_{13}H_{15}N_3O_2$

Fragment m/z	Summenformel nach Hochauflösung	Intensität [%] (ΣZerfälle = 100%)
227	$C_{13}H_{13}N_3O$	20.4
216	$C_{12}H_{14}N_3O$	29.6
203	$C_{11}H_{13}N_3O$	s. Interpretation, S. 22
184		1.6
164		0.6
152	$C_7H_8N_2O_2$	7.3
135		2.2
126	$C_6H_{10}N_2O$	34.8
93	C_6H_7N	0.6
84	$C_4H_8N_2$	1.9
56	C_3H_6N	1.0

Abb. 9: MS-Daten des Acetylaminophenazon (7)
a) EI-Spektrum (180° C, 80 eV)
b) Fragmentierung des Molekülradikalions (MS/MS-Technik)

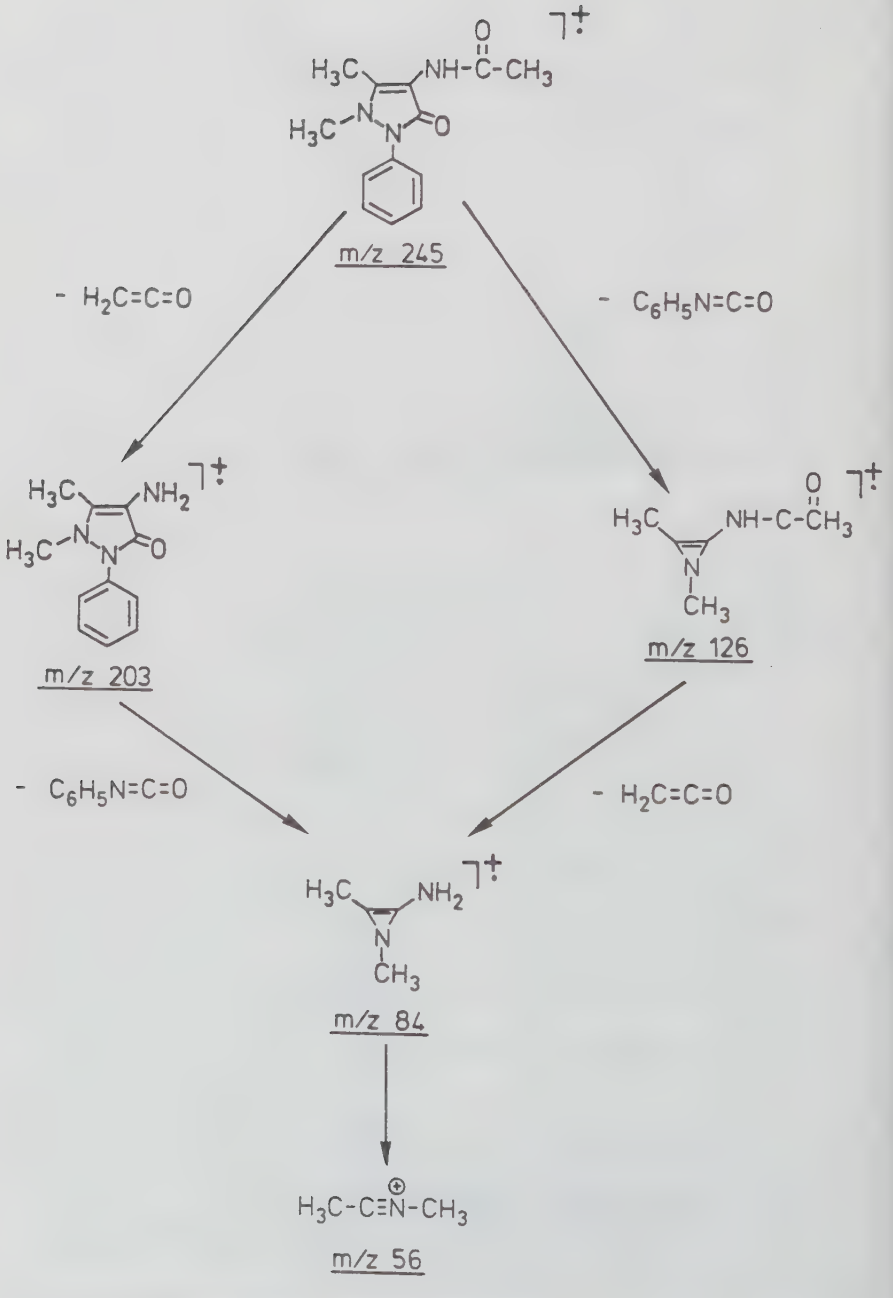


Abb. 10: Charakteristische Fragmentierungsfolge des Acetylaminophenazon (7)

c) MS-Untersuchungen der Zone $R_x = 0.56$

Die auf Seite 26 abgebildeten Daten dieser Zone waren identisch mit denen der Referenzsubstanz Aminophenazon (**6**).

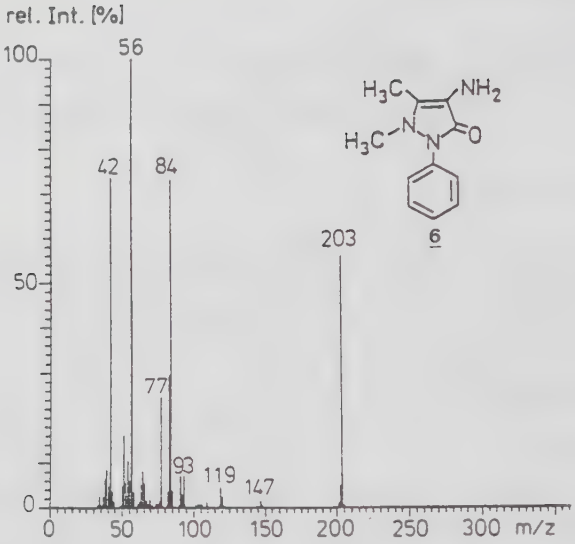
Interpretation:

Es treten zwei konkurrierende Fragmentierungen des Molekülions m/z 203 auf, die unter Bildung strukturspezifischer Bauteile verlaufen (vgl. Abb. 12, S. 27):

1) Abspaltung bzw. Bildung der Ionen m/z 119 (a) bzw. m/z 84 (b) oder
2) Fragmentierung zu m/z 147 (d) unter Abgabe des strukturspezifischen Teiles c bzw. Genese von m/z 56 (c).

Der NH_2-Substituent in der C-4-Position des Pyrazolinonsystems weist wanderungsfähige Wasserstoffatome auf, die auf die benachbarte Keto-Funktion übertragen werden können. Aus dieser Umlagerung (e) erklärt sich die Abspaltung von CHO$^{\cdot}$-Radikalen unter Bildung von m/z 174, die insbesondere unter MS/MS-Bedingungen ausgeprägt ist, da hier die außerhalb der Ionenquelle ablaufenden Zerfälle niederenergetischer Spezies erfaßt werden. Dieser Fragmentierungsschritt findet sich ebenfalls bei anderen primären oder sekundären 4-Aminopyrazolinonen (vgl. Abb. 8 und 9).

a)



6

b)

M^+ (m/z 203)
$C_{11}H_{13}N_3O$

Fragment m/z	Summenformel nach Hochauflösung	Intensität [%] (ΣZerfälle = 100%)
188	$C_{10}H_{10}N_3O$	24.4
174	$C_{10}H_{12}N_3$	29.8
161		8.1
147	$C_8H_7N_2O$	6.0
119	C_7H_5NO	6.5
109	$C_5H_7N_3$	3.8
93	C_6H_7N	2.2
84	$C_4H_8N_2$	19.0
56	C_3H_6N	0.2

Abb. 11: MS-Daten des Aminophenazon (6)
a) EI-Spektrum (100° C, 80 eV)
b) Fragmentierung des Molekülradikalions (MS/MS-Technik)

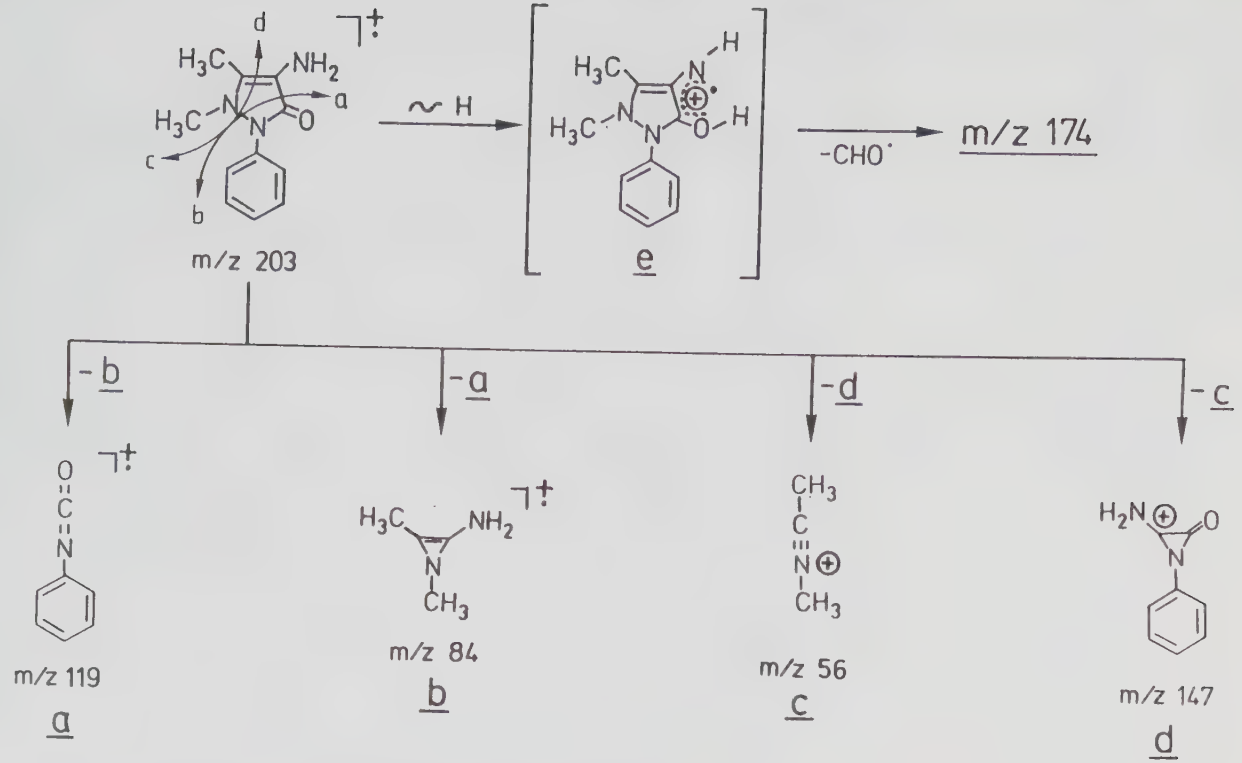


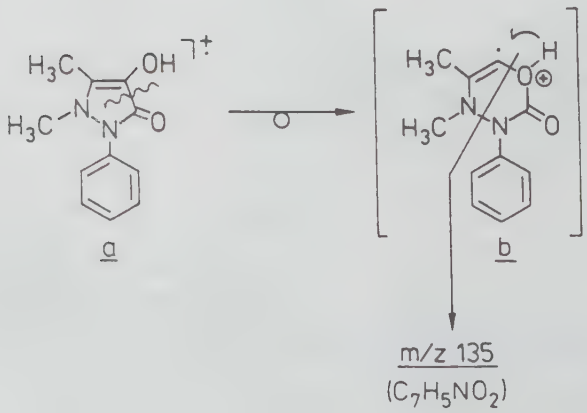
Abb. 12: Charakteristische Fragmentionen des Aminophenazon (6)

d). MS-Untersuchungen der Zone $R_x = 1.18$

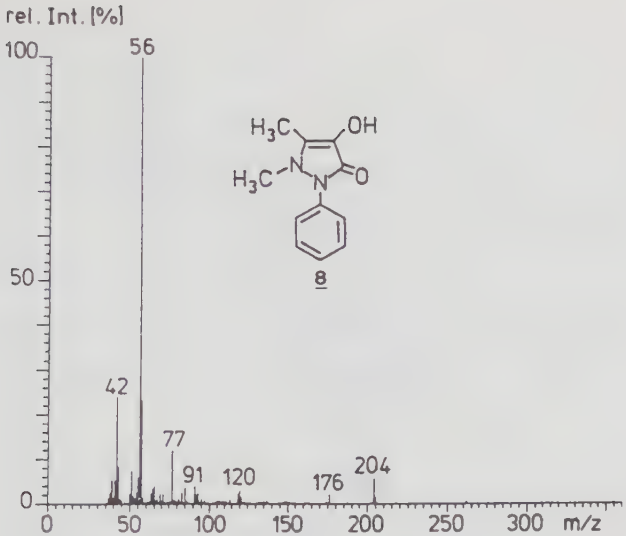
Die auf Seite 29 abgebildeten massenspektrometrischen Daten dieser Zone waren mit denen der präparativ dargestellten Referenzsubstanz Hydroxyphenazon (8) identisch.

Interpretation:

Das Molekülion m/z 204 fragmentiert unter der für hydroxylsubstituierte Heterosysteme typischen Carbonyleliminierung zu m/z 176 und im untergeordneten Ausmaß unter Abgabe von ·OH-Radikalen zu m/z 187. Die bereits beschriebene Abspaltung von $[C_3H_6N]^{\cdot}$ (ΔU 56) aus M^{+} führt zu m/z 148. Die Bildung des Ions m/z 135 setzt einen komplexen Reaktionsablauf voraus: Unter Ringöffnung (a), Cyclisierung zu einem Lacton (b) und anschließender Wasserstoffumlagerung wird eine Carboxylstruktur gebildet, die nach Spaltung der N-1,N-2-Bindung das Ion m/z 135 ($C_7H_5NO_2$) liefert.



a)



8

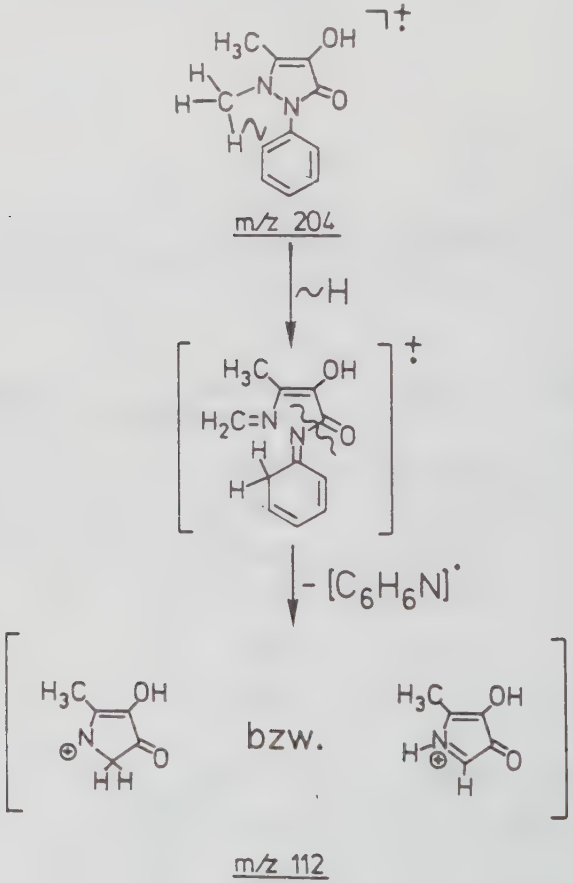
b)

M^+ (m/z 204)
$C_{11}H_{12}N_2O_2$

Fragment m/z	Summenformel nach Hochauflösung	Intensität [%] (ΣZerfälle = 100%)
187	$C_{11}H_{11}N_2O$	10.0
176	$C_{10}H_{12}N_2O$	50.0
148	$C_8H_6NO_2$	7.0
135	$C_7H_5NO_2$	5.0
121	$C_7H_9N_2$	6.0
112	$C_5H_6NO_2$	4.1
105		3.9
101		3.0
93	C_6H_7N	2.0
84	$C_4H_4O_2$	1.5
83	$C_4H_3O_2$	0.5
56	C_3H_6N	7.0

Abb. 13: MS-Daten des Hydroxyphenazon (8)
a) EI-Spektrum (40° C, 80 eV)
b) Fragmentierung des Molekülradikalions (MS/MS-Technik)

Eine Mc Lafferty-Umlagerung, die unter Wanderung eines Protons der N-2-Methylgruppe zum aromatischen Ringsystem verläuft, führt unter Abspaltung von C_6H_6-N$^{\cdot}$ zur Bildung des Fragmentes m/z 112 ($C_5H_6NO_2$)[21].



Durch die Eliminierung von N-1-Phenyl-N-2-methylhydrazin (ΔU 120) aus M^{+} entsteht das Ion m/z 84 ($C_4H_4O_2$).

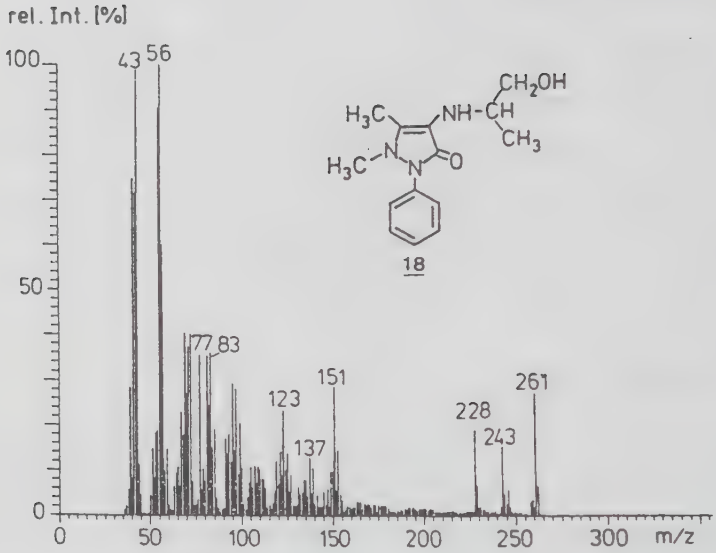
e) MS-Untersuchungen der Zone $R_x = 0.78$ (vgl. S. 16)

Im Gegensatz zu den bisher identifizierten Verbindungen stand für die massenspektrometrischen Untersuchungen dieser Zone kein authentisches Material zu Vergleichszwecken zur Verfügung. Somit kam in diesem Fall der kombinierten Anwendung von EI, CI, Hochauflösung und MS/MS-Technik besondere Bedeutung zur Strukturaufklärung zu (vgl. S. 32).

Interpretation:

Den Molpeak der Verbindung bildet das Ion m/z 261 ($C_{14}H_{19}N_3O_2$). Die Hochauflösung des $M^{+\cdot}$ zeigt, daß sich seine elementare Zusammensetzung von der des Isopropylaminophenazon (5) lediglich durch ein zusätzlich vorhandenes Sauerstoffatom unterscheidet. Neben der Hydroxylierung der Isopropylgruppe könnte der Phenylrest oder die N-2- bzw. C-3-Methylgruppe Ort des Sauerstoffangriffs sein.
Das $M^{+\cdot}$ zeigt als initiale Fragmentierungsschritte die Abspaltung einer Methylgruppe zu m/z 246 ($C_{13}H_{16}N_3O_2$) bzw. die Eliminierung von Wasser zu m/z 243 ($C_{14}H_{17}N_3O$). Der konsekutive Zerfallsprozeß ($M^{+\cdot} - CH_3/H_2O$) führt zu m/z 228 ($C_{13}H_{14}N_3O$). Der weitere Zerfall von m/z 228 verläuft zunächst unter Abspaltung eines $C_6H_5^{\cdot}$-Radikals zu m/z 151, gefolgt von einer Carbonyleliminierung unter Bildung von m/z 123 ($C_6H_9N_3$). Diese Fragmentierungsfolge beweist das Vorliegen eines intakten Phenylrestes. Im Falle einer Phenolsubstitution würde 1) die Abspaltung von $C_6H_5^{\cdot}$-Radikalen nicht auftreten und 2) die für Phenole typische

a)



18

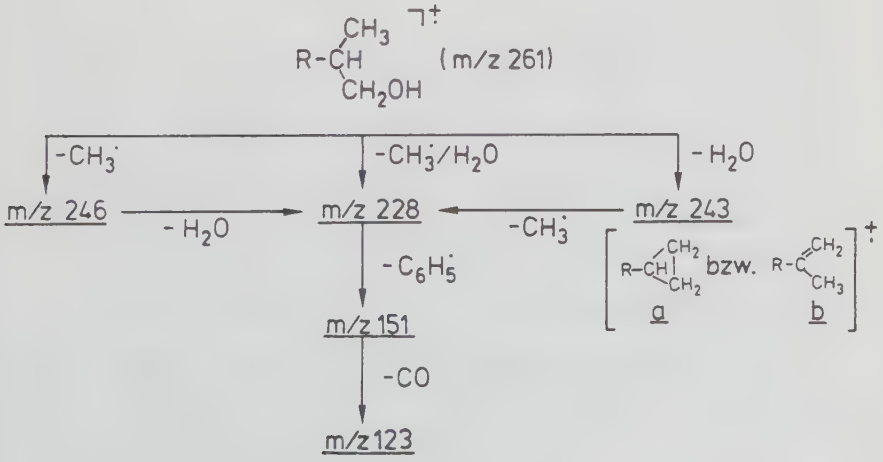
b)

M^+ (m/z 261)
$C_{14}H_{19}N_3O_2$

Fragment m/z	Summenformel nach Hochauflösung	Intensität [%] (Σ Zerfälle = 100%)
246	$C_{13}H_{16}N_3O_2$	64.3
243	$C_{14}H_{17}N_3O$	19.1
228	$C_{13}H_{14}N_3O$	11.4
216	$C_{12}H_{14}N_3O$	2.3
151	$C_7H_9N_3O$	1.8
123	$C_6H_9N_3$	0.9
56	C_3H_6N	0.2

Abb. 14: MS-Daten des Hydroxyisopropylaminophenazon (18)
a) EI-Spektrum (100° C, 80 eV)
b) Fragmentierung des Molekülradikalions (MS/MS-Technik)

CO-Eliminierung direkt aus dem Molekülion erfolgen. Darüber hinaus beweist das Auftreten des Schlüsselions m/z 56, daß weder die N-2- noch die C-3-Methylgruppe hydroxyliert ist (vgl. S. 21). Somit liegt offensichtlich eine Hydroxylierung am Isopropylrest vor, die sowohl an einer der beiden primären Methylgruppen als auch am tertiären C-Atom denkbar wäre. Die starke Wasserabspaltung weist jedoch auf das Vorliegen einer primären alkoholischen Funktion hin. Der beteiligte Wasserstoff kann von der benachbarten Methylgruppe (a) oder vom tertiären Kohlenstoffatom (b) geliefert werden. Beide Reaktionswege führen zu stabilen Fragmentionen der Masse m/z 243. Dagegen wäre beim Vorliegen eines tertiären Alkohols eine intensive Abspaltung von ÖH-Radikalen aus dem Molekülion zu erwarten.



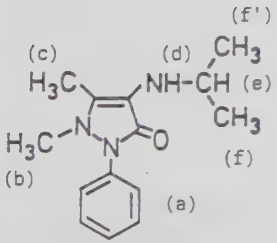
f.) MS-Untersuchungen der Zonen R_x = 1.38 und R_x = 1.86 (vgl. S.16)

Diese beiden farbigen Produkte traten nur nach enzymatischer Vorbehandlung des Harnes auf (vgl. S. 15).
Die MS-Daten waren a) für die Substanz der Zone R_x = 1.38 mit denen der Methylrubazonsäure (27) und b) für die Substanz der Zone R_x = 1.86 mit denen der Rubazonsäure (26) identisch. Bislang konnte am Beispiel anderer Aminopyrazolinone nicht eindeutig geklärt werden, ob es sich bei diesen Verbindungen um genuine Biotransformationsprodukte oder Aufarbeitungsartefakte handelt[22,23].
Auch bei den vorliegenden Untersuchungen entstanden 26 und 27 erst nach Hydrolyse des Harns, obwohl aufgrund der Strukturen der Substanzen (s. S. 70) eine Konjugation unwahrscheinlich ist. Somit liegt auch hier die Vermutung nahe, daß Rubazon- (26) und Methylrubazonsäure (27) keine originären Metaboliten sind.
Da diese Fragestellung für die gesamte Substanzklasse von großer Bedeutung ist, wurden Dimethylaminophenazon (3) und Noramidopyrinmethansulfonat-Natrium (4) ebenfalls diesbezüglich untersucht. Diese Ergebnisse, die spektroskopischen Daten von 26 und 27 sowie Theorien zur Bildung der beiden Farbstoffe, die die Resultate vergleichender Biotransformationsstudien zu 3 und 4 berücksichtigen, werden in einem gesonderten Kapitel (s.Kap.3,S.69ff.) beschrieben und diskutiert.

1.1.3. DC/^{1}H-NMR-Untersuchungen

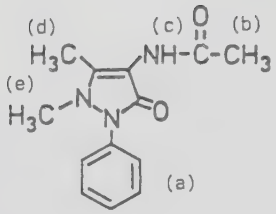
Zur zusätzlichen Struktursicherung wurde versucht, die präparativ dünnschichtchromatographisch angereicherten Metaboliten durch ^{1}H-Kernresonanzspektroskopie zu charakterisieren. Eindeutige Ergebnisse ließen sich allerdings nur für diejenigen Biotransformationsprodukte erhalten (Isopropylaminophenazon (5), Acetylaminophenazon (7) und Hydroxyphenazon (8)), die in ausreichender Konzentration vorlagen. Die zu geringen Anteilen im Untersuchungsmaterial vorhandenen Metaboliten waren nach entsprechender Aufarbeitung zwar massenspektrometrisch zu identifizieren (s. 1.1.2.), erlaubten jedoch aufgrund des Verhältnisses von Substanzmenge und störender Matrixbestandteile keine differenzierte ^{1}H-NMR-Analytik.

(Die ^{1}H-NMR-Strukturcharakteristika der Verbindungen 5, 7 und 8 sind in den Abb. 15-17 dargestellt.)



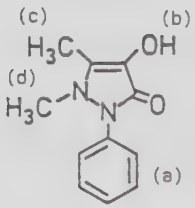
δ [ppm]	(interner Standard TMS)	
1.13	6 H, d, $CH<^{CH_3}_{CH_3}$	(f, f')
2.15	3 H, s, C-CH_3	(c)
2.87	3 H, s, N-CH_3	(b)
3.06-3.58	1 H, m, $CH<^{CH_3}_{CH_3}$	(e)
7.2 -7.6	5 H, m, C_6H_5 (Aromat)	(a)
*		

Abb. 15: Protonenresonanzen des Isopropylaminophenazon (5)
(Aufnahmemedium: $CDCl_3$)
(zu den verwendeten Abkürzungen s. S. 36)
* NH (d) nicht zu erkennen



δ [ppm] (interner Standard TMS)		
2.06	3 H, s,	CO-$\underline{CH}_3$ (b)
2.22	3 H, s,	C-$\underline{CH}_3$ (d)
3.01	3 H, s,	N-$\underline{CH}_3$ (e)
7.2-7.6	5 H, m,	$C_6\underline{H}_5$ (Aromat) (a)
8.95	1 H, s,	$\underline{NH}$ (c)

Abb. 16: Protonenresonanzen des Acetylaminophenazon (7)
(Aufnahmemedium: DMSO-d_6)



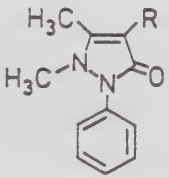
δ [ppm] (interner Standard TMS)		
2.10	3 H, s,	C-$\underline{CH}_3$ (c)
2.80	3 H, s,	N-$\underline{CH}_3$ (d)
7.2-7.6	5 H, m,	$C_6\underline{H}_5$ (Aromat) (a)
8.51	1 H, s,	$\underline{OH}$ (breit) (b)

Abb. 17: Protonenresonanzen des Hydroxyphenazon (8)
(Aufnahmemedium: DMSO-d_6)

Abkürzungen: s - Singulett, d - Dublett, m - Multiplett

1.1.4. Wertende Zusammenfassung der Ergebnisse des Metabolitenscreening nach DC-Trennung

Unter Anwendung der Dünnschichtchromatographie in Verbindung mit Analysenverfahren der Massenspektrometrie und der ^{1}H-Kernresonanzspektroskopie konnten fünf Substanzen als renale Exkretionsprodukte des Isopropylaminophenazon (**5**) beim Menschen aufgeklärt werden.



Nr.	R	Rx-Wert (DC)	Methode der Aufarbeitung	Strukturisicherung durch
5	$-NH-CH<^{CH_3}_{CH_3}$	1.00	A, B	MS, ^{1}H-NMR, Referenzsubstanz
6	$-NH_2$	0.56	A	MS, Referenzsubstanz
7	$-NH-C<^{O}_{CH_3}$	0.34	A, B	MS, ^{1}H-NMR, Referenzsubstanz
8	$-OH$	1.18	B	MS, ^{1}H-NMR, Referenzsubstanz
18	$-NH-CH<^{CH_3}_{CH_2OH}$	0.78	B	MS

Verfahren: A - Direktextraktion (vgl. S. 127)
B - Extraktion nach enzymatischer Hydrolyse (vgl. S. 128)

Abb. 18: Ergebnisse des Metabolitenscreening nach präparativer DC

Besonderes Interesse verdient das Auftreten zweier farbiger Produkte (ausschließlich nach hydrolytischer Vorbehandlung des Harns), die als Rubazon- (26) und Methylrubazonsäure (27) identifiziert werden konnten (s. S.34). Seit langem wird anhand anderer Aminopyrazolinonderivate - besonders am Beispiel des Dimethylaminophenazon (3) - die Frage kontrovers diskutiert, ob es sich bei diesen Substanzen um genuine Biotransformationsprodukte oder aufarbeitungsbedingte Artefakte handelt[22,23] (vgl. hierzu auch S.69ff.).
N-2-Norverbindungen, die nach hydrolytischer Spaltung aus ihren Konjugaten freigesetzt werden, sollen Präcursoren dieser beiden dimeren Farbstoffe sein, wobei zur Bildung der Methylrubazonsäure (27) zusätzlich ein N-2-methylierter Reaktand benötigt wird[23].
In den vorliegenden Untersuchungen zum Isopropylaminophenazon (5) könnte u.a. Aminophenazon (6) die Rolle der N-2-Methylkomponente zukommen, da diese Verbindung nach Hydrolyse des Harns in keinem Fall mehr auffindbar war. (s. S. 15). Andererseits konnte mit den bislang angewandten Methoden kein N-2-demethyliertes Derivat des Isopropylaminophenazon (5) nachgewiesen werden, welches als Vorläufer für die Bildung der Rubazonsäure zu fordern wäre. Folglich mußte nach Aufarbeitungs- und Analysenverfahren gesucht werden, die unter Vermeidung möglicher Artefaktbildungen die Identifizierung intakter Konjugate ermöglichen.

1.2. Massenspektrometrische Untersuchungen von Metabolitengemischen durch fraktionierte Verdampfung

Aus den unter 1.1.2. beschriebenen MS-Untersuchungen wurden differenzierte Kenntnisse über das Fragmentierungsverhalten einiger Metaboliten von 5 gewonnen. Es wurde gezeigt, daß der Abbau von Pyrazolinonstrukturen - mit Ausnahme der Bildung des Ions m/z 56, das stets auf ein N-2,C-3-dimethyliertes Derivat hinweist - keinem einheitlichen Schema unterliegt, sondern z.B. stark abhängig ist von der Substitution in der C-4-Position und folglich für jede einzelne Verbindung spezifisch. Basierend auf diesen Informationen sollte es nunmehr möglich sein, auch komplexe Gemische von Biotransformationsprodukten von 5 zu analysieren.
Bei der fraktionierten Verdampfung solcher Gemische in der Ionenquelle eines Hochauflösungsmassenspektrometers konnte die elementare Zusammensetzung der Einzelkomponenten bestimmt und durch Kombination mit der MS/MS-Technik ihre Ionenstruktur nachgewiesen werden. Das Vorliegen von Molekülionen wurde durch chemische Ionisation unter gleichen Temperaturbedingungen bewiesen; zusätzlich konnten elektronenstoßinduzierte Fragmente erkannt werden. In Abhängigkeit von der Temperatur der Ionenquelle wurden sowohl glucuronidierte als auch sulfatierte Metaboliten (ohne vorherige enzymatische bzw. saure Hydrolyse) allein aufgrund thermischer Belastung in die korrespondierenden Phase-I-Strukturen überführt und als solche neben unkonjugierten

Verbindungen registriert[24]. So sollte es möglich sein, die aufarbeitungsbedingte Artefaktbildung (vgl. S. 34) weitestgehend zu vermeiden.

Voraussetzung für die Anwendung dieses Verfahrens war die schonende Anreicherung genuin im Harn vorliegender Biotransformationsprodukte. Zu diesem Zweck wurde sowohl die direkte - als auch die XAD-säulenchromatographische Methanolextraktion (s. S. 129) getestet. Grundsätzlich zeichneten sich die erhaltenen XAD-Extrakte durch eine wesentlich geringere Menge störender Begleitsubstanzen (Matrixbestandteile) aus, enthielten jedoch einen hohen Harnstoffanteil. Dieser wirkte sich bei der fraktionierten Verdampfung der Extrakte insbesondere dadurch negativ aus, daß die Metaboliten relativ in ihren Intensitäten unterdrückt wurden. Diese Störung ließ sich durch eine der Extraktion vorangehende Ureasespaltung (s. S. 129) umgehen; wobei der dabei freigesetzte Ammoniak keinen Einfluß auf die Stabilität der metabolischen Strukturen hatte.

Der XAD-Extrakt wurde im Temperaturbereich von 20° C bis 400° C direkt in der Ionenquelle des Massenspektrometers verdampft. Die Intensitäten der registrierten Ionen wurden in Abhängigkeit von der Verdampfungstemperatur als sog. Massenchromatogramm dargestellt. Ein derartiges Chromatogramm ermöglicht es, die Intensitätsmaxima ausgewählter Ionen zu ermitteln und die optimalen Aufnahmebedingungen der verschiedenen Verbindungen in Gemischen zu bestimmen.

Die folgende Abbildung zeigt das Massenchromatogramm der bei der fraktionierten Verdampfung des XAD-Extraktes registrierten Ionen im Massenbereich von m/z 200 bis m/z 300, in dem die Molekülionen der Metaboliten von 5 auftreten. Ein analog aufgearbeiteter Leerharn zeigte in dieser Massenzone keine Ionen relevanter Intensität.

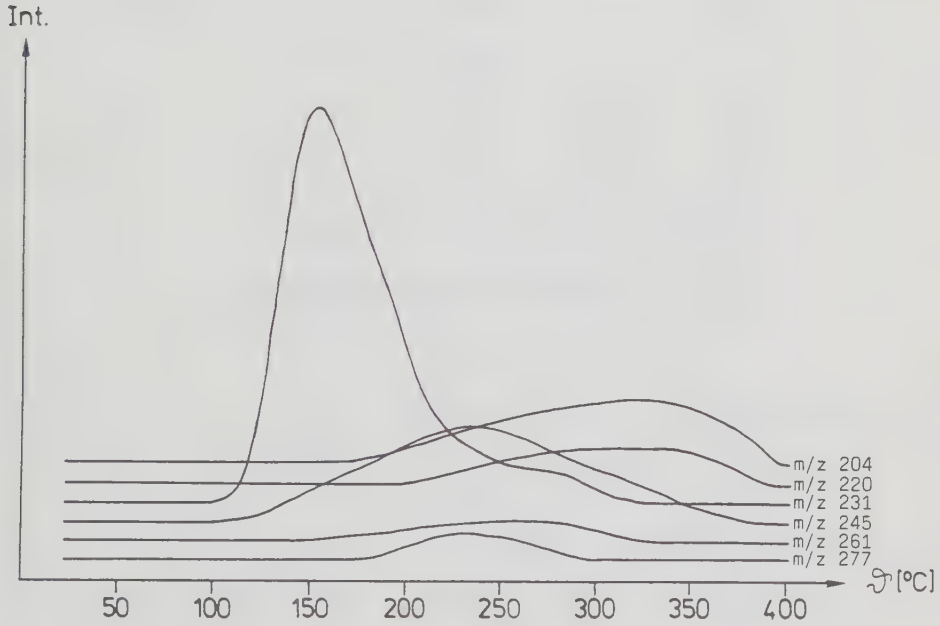


Abb. 19: Massenchromatogramm der fraktionierten Verdampfung eines XAD-Harnextraktes nach Einnahme von Isopropylaminophenazon (5)

Das EI-Spektrum bei 220° C zeigt alle Ionen des untersuchten Massenbereiches (s. Abb. 20 a). Zur Kontrolle des Vorliegens

intakter Molekülionen im Gemisch wurden durch chemische Ionisation die entsprechenden $[M + H]^+$-Ionen nachgewiesen (s. Abb. 20 b).

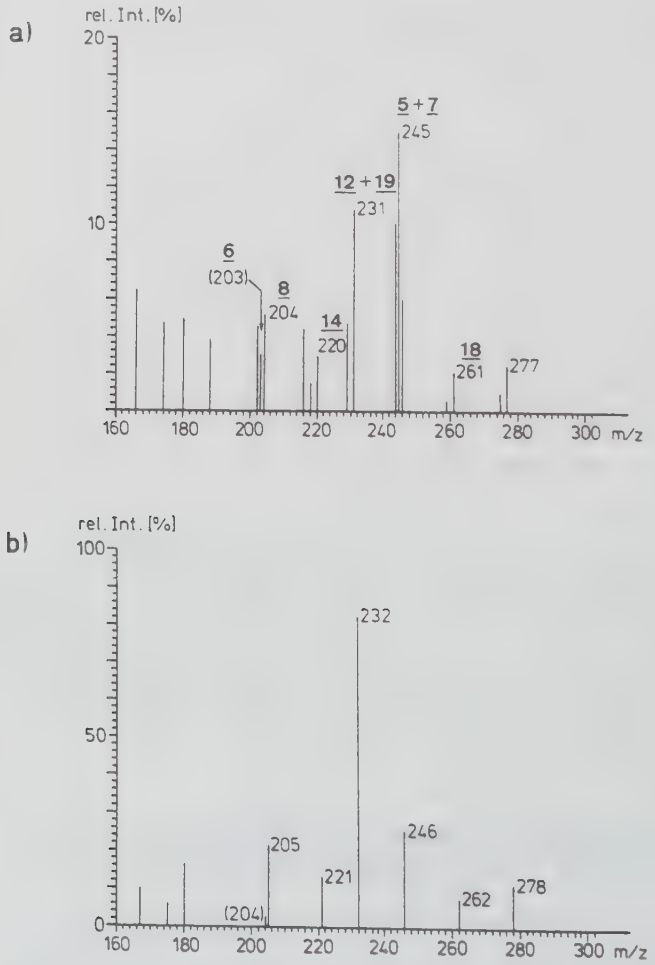


Abb. 20: Massenspektren eines XAD-Harnextraktes nach Einnahme von 5
a) Elektronenstoßionisationsspektrum (220° C)
b) Spektrum der chemischen Ionisation (220° C)
(Spektren sind untergrundbereinigt)

Die elementare Zusammensetzung der Molekülionen wurde durch Hochauflösung ermittelt. Bei Ionen, die nicht einheitlich zusammengesetzt waren - z.B. bei verschiedenen Metaboliten gleicher Massenzahl - werden die jeweiligen Anteile in der folgenden Tabelle aufgeführt.

EI (80 eV, 220°C)	Summenformel	ber. Masse	gef. Masse	rel. Anteil [%]
(203)	$C_{11}H_{13}N_3O$	203,1059	203,1054	
204	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	204,0899	204,0895	
220	$C_{11}H_{12}N_2O_3$	220,0848	220,0845	
231	$C_{13}H_{17}N_3O$	231,1372	231,1372	90
231	$C_{12}H_{13}N_3O_2$	231,1007	231,0922	10
245	$C_{14}H_{19}N_3O$	245,1528	245,1529	40
245	$C_{13}H_{15}N_3O_2$	245,1164	245,1170	60
261	$C_{14}H_{19}N_3O_2$	261,1477	261,1470	
277	$C_{14}H_{19}N_3O_3$	277,1427	277,1416	5
277	$C_{17}H_{15}N_3O$	277,1215	277,1216	95

Tab. 2: Hochauflösungsdaten der Molekülionen des EI-Gemischspektrums

Das Vorliegen von $[M-2H]^+$-Ionen (m/z: 204/202, 220/218, 261/259 und 277/275) im EI-Gemischspektrum bei 220° C kann durch thermisch bedingte Dehydrierungen erklärt werden. Zusätzlich konnte das Ion m/z 246 (O-Acetylhydroxyphenazon; $C_{13}H_{14}N_2O_3$; ber.: 246.1006; gef.: 246.1006) als Artefakt einer Gasphasenreaktion erkannt werden, da es unter CI-Bedingungen kein entsprechendes $[M+H]^+$-Ion bildet.

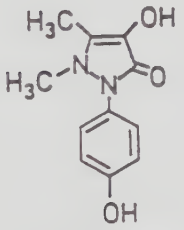
Die Summenformeln der Massen m/z 204 ($C_{11}H_{12}N_2O_2$), m/z 245 ($C_{14}H_{19}N_3O$), m/z 245 ($C_{13}H_{15}N_3O_2$) und m/z 261 ($C_{14}H_{19}N_3O_2$) entsprachen denen der bereits präparativ isolierten und identifizierten renalen Exkretionsprodukte Hydroxyphenazon (8), Isopropylaminophenazon (5), Acetylaminophenazon (7) und Hydroxyisopropylaminophenazon (18). Das Molekülion der Masse m/z 203 ($C_{11}H_{13}N_3O$) repräsentierte Aminophenazon (6). Wie auch in Kapitel 1.1.1. beschrieben, konnte diese Verbindung nicht in allen Proben oder nur zu geringem Anteil nachgewiesen werden (vgl. S. 15). Zusätzlich wird das Ion m/z 203 unter EI-Bedingungen durch Ketenabspaltung aus Acetylaminophenazon (7) gebildet. Das CI-Spektrum des isolierten Metaboliten 7 zeigt diese für acetylierte Strukturen typische Fragmentierung jedoch nicht. Daher kann im CI-Gemischspektrum aus m/z 204 auf das Vorliegen von Aminophenazon (6) geschlossen werden.

Außer den Molekülionen der bereits beschriebenen Metaboliten traten M^{+}-Ionen der Massen m/z 220, 231 und 277 auf. Die Intensität der in Tab. 2 aufgeführten Ionen erlaubte die Aufnahme von MS/MS-Spektren jeder einzelnen Verbindung; diese sollen im folgenden dargestellt und beschrieben werden.

1) Im Metabolitengemisch entsprachen die Fragmentierungsmuster und Intensitätsverteilungen der MS/MS-Spektren von m/z 204 und m/z 261 denen, die in Abb. 13 (s. S. 29) und Abb. 14 (s. S. 32) aufgeführt sind. Danach kann eindeutig auf das Vorliegen von Hydroxyphenazon (8) und Hydroxyiso-

propylaminophenazon (18) im XAD-Extrakt geschlossen werden.

2) Das Molekülion m/z 220 ($C_{11}H_{12}N_2O_3$) charakterisiert ein durch Hydroxylierung des Phenylrings des Hydroxyphenazon (8) gebildetes Biotransformationsprodukt.



14

M^+ (m/z 220) $C_{11}H_{12}N_2O_3$	Fragment m/z	Summenformel nach Hochauflösung	Intensität [%] (Σ Zerfälle = 100%)
→	205	$C_{10}H_9N_2O_3$	44.0
→	191	$C_{10}H_{11}N_2O_2$	10.6
→	160	$C_9H_8N_2O$	17.6
→	127	$C_5H_7N_2O_2$	13.2
→	93	C_6H_5O	11.7
→	56	C_3H_6N	2.9

Abb. 21: Fragmentierung des Molekülradikalions von 14 (MS/MS-Technik)

Interpretation:

Im Gegensatz zu Hydroxyphenazon (8) tritt im MS/MS-Spektrum von Dihydroxyphenazon (14) eine initiale CH_3-Abspaltung unter Bildung von m/z 205 bevorzugt auf. Die Einführung einer OH-Funktion in ortho- bzw. para-Stellung des Phenylrestes führt durch einen +M-Effekt zu einer partiellen Schwächung der N-CH_3-Bindung und bewirkt dieses Fragmentierungsverhalten. Weitere Beweise für das Vorliegen einer Hydroxylierung des Aromaten sind:

a) die für Phenole typische CHO-Abspaltung, die zu m/z 191 führt und
b) die Bildung von $[C_6H_5O]^+$-Ionen (m/z 93) unter Abspaltung von ΔU 127 ($C_5H_7N_2O_2$).

Das Ion m/z 56 (C_3H_6N) sichert auch im vorliegenden Fall die N-2,C-3-Dimethylsubstitution des Pyrazolinonsystems.

3) Das Ion der Masse m/z 231 war nicht einheitlich zusammengesetzt. Durch die exakte Massenbestimmung wurden die Anteile ermittelt: es ergab sich zu 90% das Ion der Summenformel $C_{13}H_{17}N_3O$ (N-2-Norisopropylaminophenazon (19)) und zu 10% ein Ion $[C_{12}H_{13}N_3O_2]^+$ (N-2-Noracetylaminophenazon (12)). Daher weist das MS/MS-Spektrum die Überlagerung der Einzelspektren beider Verbindungen auf (s. Abb. 22, S. 47).

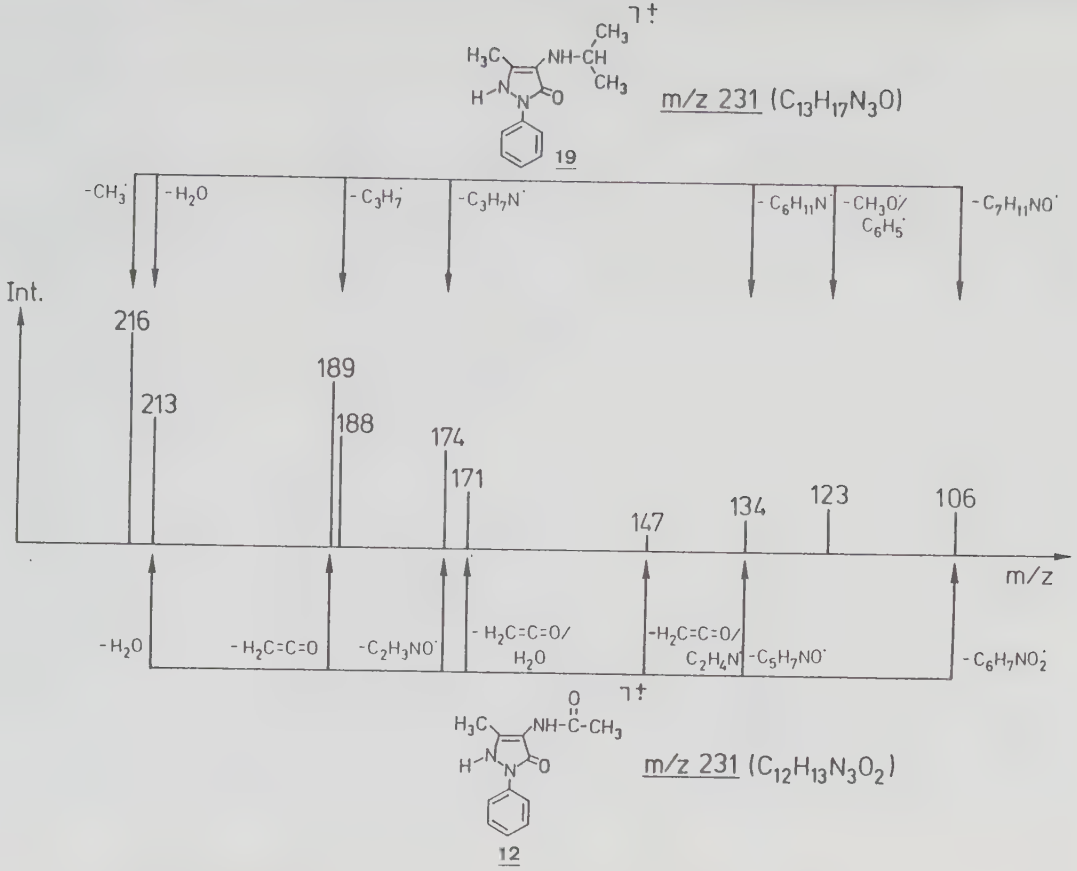


Abb. 22: Überlagertes MS/MS-Spektrum der Molekülradikalionen von **12** und **19**

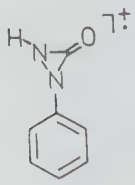
Interpretation:

Von besonderer Bedeutung für die Differenzierung beider Strukturen im Gemisch ist:

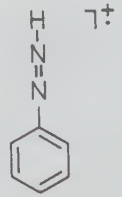
a) der für N-2-Norisopropylaminophenazon (19) typische Initialfragmentierungsschritt zu m/z 188 ($C_{10}H_{10}N_3O$), der die Eliminierung der Isopropylgruppe kennzeichnet und

b) die für N-2-Noracetylaminophenazon (12) charakteristische Ketenabspaltung, die zu m/z 189 ($C_{10}H_{11}N_3O$) führt. (vgl. zu a) und b) auch S. 18 ff. und 22 ff.)

Das Fragmention der Masse m/z 174 ($C_{10}H_{10}N_2O$), das strukturell dem N-2-Norphenazon entspricht, wird durch Eliminierung des C-4-Substituenten aus beiden Biotransformationsprodukten gebildet. Die Spaltung der N-2,C-3- und der C-4,C-5-Bindungen beider Substanzen führt zur Bildung eines N-1-Phenyldiaziron-Radikalkations a (m/z 134, $C_7H_6N_2O$), der Bindungsbruch zwischen N-2, C-3 und N-1, C-5 erklärt das Auftreten eines Phenylhydrazin-Radikalkations b (m/z 106, $C_6H_6N_2$).

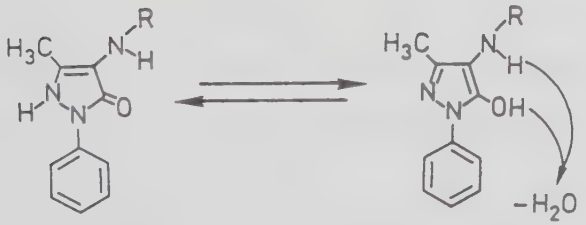


a



b

Auffällig ist die hohe Intensität des Ions m/z 213, das durch die initiale Eliminierung von H_2O aus den Molekülionen beider N-2-Norverbindungen gebildet wird. Aufgrund des Vorliegens tautomerer Grenzstrukturen kann dieses Fragmentierungsverhalten zwanglos erklärt werden. Aus der C-5-OH-Form wird nach Wanderung des Protons des vicinalen Aminosubstituenten die Wasserabspaltung verständlich. Im Falle N-2-methylierter Aminopyrazolinone wurde ein derartiger Initialfragmentierungsschritt nicht beobachtet. Daher liegt die Vermutung nahe, daß die H_2O-Eliminierung einen für entsprechende N-2-Norderivate charakteristischen primären Zerfall darstellt.



Das Vorliegen von N-2-Norpyrazolinonstrukturen wird darüber hinaus dadurch bewiesen, daß das für die N-2,C-3-Dimethylsubstitution typische Fragment m/z 56 nicht auftritt.

4) Das Ion m/z 245 entsprach nach Hochauflösung einem Gemisch von Isopropylaminophenazon (5) ($C_{14}H_{19}N_3O$) und Acetylaminophenazon (7) ($C_{13}H_{15}N_3O_2$) im Verhältnis 4:6. Daher zeigte das MS/MS-Spektrum dieses durchmischten Ions die Summe der Fragmente beider Komponenten (vgl. S. 19, Abb. 8 und S. 23, Abb. 9). Nebeneinander konnten die für 5 typische Abspaltung des Isopropylrestes (→ m/z 202) und die spezifische Keteneliminierung des Acetylaminophenazon (7) (→ m/z 203) gefunden werden. Ferner sichert das Schlüsselion m/z 137 auch in der Gemischanalyse das Vorliegen von 5.

5) Auch das Ion der Masse m/z 277 bestand aus 2 Komponenten. 95% entsprachen einer Verbindung der Summenformel $C_{17}H_{15}N_3O$; die verbleibenden 5% wiesen in der Hochauflösung die Zusammensetzung $C_{14}H_{19}N_3O_3$ auf.
Die im geringeren Anteil vorliegende Substanz sollte ein dihydroxyliertes Derivat des Isopropylaminophenazon (5) darstellen, wobei die Einführung einer OH-Funktion am aromatischen System des bereits beschriebenen Metaboliten Hydroxyisopropylaminophenazon (18) zu diskutieren wäre. Die überwiegend vorhandene Verbindung $C_{17}H_{15}N_3O$ konnte in gleichartig aufgearbeiteten Leerharnproben nicht nachgewiesen werden. Sie sollte folglich kein extrahierter Bestandteil der physiologischen Matrix sein.
Aufgrund des Verhältnisses von C-, H-, N- und O-Atomen

gemäß Hochauflösungsdaten könnte vermutet werden, daß es sich dabei auch um ein Derivat des Aminopyrazolinon handelt. Die elementare Zusammensetzung kann mit der Azomethinstruktur eines 4-N-C_7H_5-substituierten N-2-Noraminopyrazolinon erklärt werden. Die Entstehung dieses offensichtlichen Artefaktes wäre durch alimentär bedingt im Organismus vorhandene Benzoesäurederivate (z.B. aus Konservierungsmitteln) denkbar. Da dieses Phänomen nicht näher untersucht wurde, soll diese Substanz bei den weiteren Diskussionen nicht berücksichtigt werden.

Die Anwendung der XAD-Extraktion in Kombination mit verschiedenen massenspektrometrischen Verfahren (fraktionierte Verdampfung, chemische Ionisation, Hochauflösung, MS/MS-Technik) ermöglichte das Auffinden von 3 weiteren Biotransformationsprodukten des Isopropylaminophenazon (5):

N-2-Norisopropylaminophenazon (19),
N-2-Noracetylaminophenazon (12) und
Dihydroxyphenazon (14).

Die bereits präparativ dünnschichtchromatographisch isolierten und massenspektrometrisch identifizierten Metaboliten 5, 6, 7, 8 und 18 konnten auch im Gemisch bestätigt werden.

Ein wesentlicher Vorteil des in diesem Kapitel beschriebenen Verfahrens besteht darin, daß bei schonender Aufarbeitung und im Verhältnis zu den anderen Methoden relativ geringem Zeitaufwand ein qualitativer Überblick über die Biotransformation eines Pharmakon gewonnen wird. Die Anwendbarkeit dieses Screening auf andere Pyrazolinonderivate wird in Kapitel 2.(s. S.58f.) beschrieben.

Im Harn vorliegende Phase-II-Metaboliten werden durch thermische Spaltung in die korrespondierenden Phase-I-Strukturen überführt und als solche massenspektrometrisch identifiziert. Eine Aussage über die Art der Konjugation - Sulfate oder Glucuronide - wäre nur bei Vorliegen von Referenzsubstanzen möglich. Böttcher[24] konnte zeigen, daß unterschiedlich konjugierte Metaboliten des Phenazon (1) aufgrund der temperaturabhängigen Spaltung dieser Phase-II-Metaboliten bei der MS-Analyse differenziert werden können.

Zum Nachweis intakter Konjugate des Isopropylaminophenazon (5) wurde alternativ eine besonders für thermolabile Systeme geeignete Ionisierungsmethode - die "Fast Atom Bombardment"-Massenspektrometrie (FAB/MS) - gewählt.

1.3. Untersuchungen von Metabolitengemischen durch "Fast Atom Bombardment" (FAB)-Massenspektrometrie

Die "Fast Atom Bombardment"-Massenspektrometrie[25,26] bezeichnet ein Ionisierungsverfahren, das insbesondere zum Nachweis schwer flüchtiger, hochmolekularer , polarer bzw. thermisch labiler Verbindungen eingesetzt werden kann. Bei dieser MS-Methode werden zunächst Edelgasatome (z.B. Ar, Xe) ionisiert, hochbeschleunigt (ca. 8 kV) und beim Durchfliegen einer Zone hoher Gasdichte entladen. Die FAB-Quelle verlassen dann stark beschleunigte Edelgasatome, die auf einen Probenträger gelenkt werden, der die zu untersuchende Probe gelöst in einer flüssigen Matrix mit niedrigem Dampfdruck (hier: Glycerin) enthält. Als Ergebnis des Atombeschusses entstehen in der Matrix entweder durch Protonierungsreaktionen $[M+H]^+$-Ionen oder entsprechende Alkalicluster ($[M+Na]^+$ bzw. $[M+K]^+$). Die Salzbildung kann durch Alkaliverunreinigungen der Probe bzw. durch künstlichen Zusatz auftreten. Die resultierenden (+)-FAB-Spektren zeigen vorwiegend die m/z-Werte der o.g. Ionisierungsprodukte neben wenigen, jedoch strukturspezifischen Fragmentionen.
Auf diese Weise können auch intakte Glucuronid- bzw. Sulfatkonjugate von Phase-I-Metaboliten nachgewiesen werden, die unter anderen Ionisierungsbedingungen (z.B. EI, CI) thermisch zerfallen würden. Neben der Bildung positiver Spezies können bei geeigneten Substanzklassen auch hohe

Ausbeuten negativer Ionen gebildet werden ($[M-H]^-$).
Die Tendenz zur Bildung negativer Ionen sollte durch Hydroxylfunktionen in Glucuronsäure- bzw. Sulfatkonjugaten begünstigt werden.
Die Anwendbarkeit des Verfahrens wird grundsätzlich eingeschränkt bei Gemischen, in denen die Komponenten unterschiedliche Ionisierungswahrscheinlichkeiten besitzen. Durch die konkurrierende Bildung von Ionen kann die Nachweisempfindlichkeit einer schlechter ionisierbaren Substanz eingeschränkt werden. Bei Metabolitengemischen ist somit nicht das Auffinden sämtlicher Biotransformationsprodukte garantiert.
XAD-Extrakte von Harnproben nach Gabe von Isopropylaminophenazon (5) wurden sowohl unter positiven als auch negativen FAB-Bedingungen vermessen (s. S. 55 , Abb. 23).
Das (+)-FAB-Spektrum zeigte das Vorliegen des N-2-Norisopropylaminophenazonglucuronid (21)* und des N-2-Noracetylaminophenazonglucuronid (22)*. Da die Molekülionen der korrespondierenden Phase-I-Strukturen 19 und 12 gleiche Massenzahl (m/z 231) aufweisen, wurden für die Konjugate 21 und 22 die protonierten Molekülionen bei m/z 408 sowie die entsprechenden Natrium- und Kaliumaddukte bei m/z 430 und m/z 446 registriert. Unter (-)-FAB-Bedingungen wurde dieses Ergebnis durch das Auftreten der deprotonierten Konjugate bei m/z 406 bestätigt. Eine Differenzierung beider Strukturen konnte nicht erfolgen, da weder die Hochauflösung der FAB-Spektren noch eine Kombination von FAB- und

---

* Strukturformeln s. S. 57

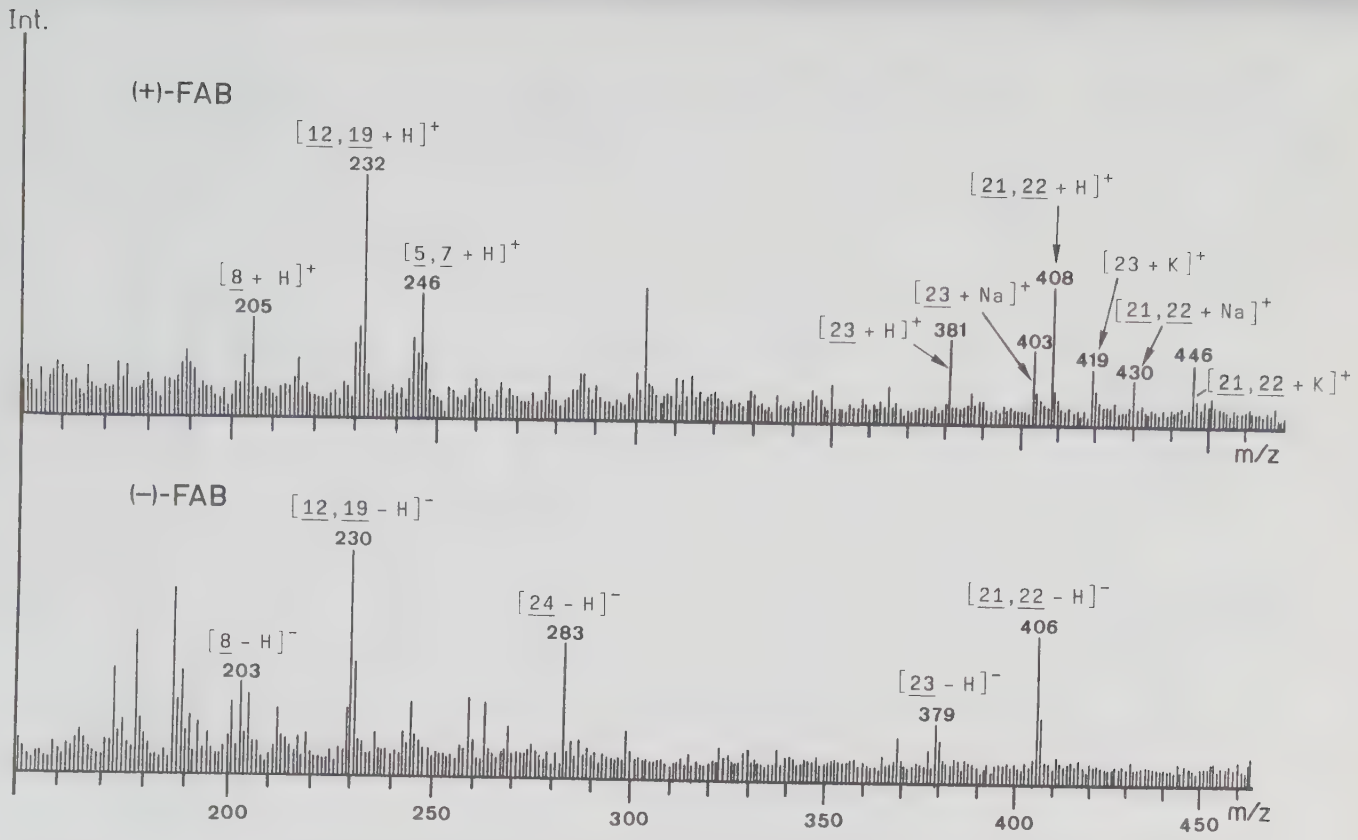


Abb. 23: "Fast Atom Bombardment"-Massenspektren ((+)-FAB/ (-)-FAB) eines XAD-Harnextraktes nach Einnahme von 5

8 : korrespondierende Phase-I-Struktur von 23 und 24

12, 19 : korrespondierende Phase-I-Strukturen von 21 und 22

(vgl. Text S. 54 und 56)

MS/MS-Technik möglich war. Aufgrund der relativen Anteile von 19 und 12 bei der fraktionierten Verdampfung (Verhältnis 9 : 1, vgl. S. 43, Tab. 2) und der Befunde zur Beteiligung der Metaboliten des Isopropylaminophenazon (5) an der Bildung der Farbstoffe 26 und 27 (vgl. S.69ff.) ist jedoch das Vorliegen beider Konjugate zu fordern.
Für Hydroxyphenazon (8) konnte sowohl die Glucuronsäure- als auch die Sulfatkonjugation bewiesen werden. Im (+)-FAB-Spektrum repräsentieren die Ionen m/z 381, 403 und 419 die positiven Ionisierungsprodukte $[23 + H]^+$, $[23 + Na]^+$ und $[23 + K]^+$ des Hydroxyphenazonglucuronid (23)*. Bei der (-)-FAB-Analyse trat das Ion m/z 379 ($[23 - H]^-$) auf.
Das Hydroxyphenazonsulfat (24)* wurde durch die hohe Intensität des Ions m/z 283 ($[24 - H]^-$) im (-)-FAB gesichert.
Weitere Strukturen konnten nicht nachgewiesen werden, wobei ihr Vorliegen aufgrund unterschiedlicher Ionisierungswahrscheinlichkeiten der Einzelkomponenten im Gemisch allerdings auch nicht ausgeschlossen werden konnte.

1.4. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Untersuchungen zur Biotransformation von Isopropylaminophenazon (5) haben gezeigt, daß im Humanharn neben unverändertem Wirkstoff Metaboliten auftreten, die durch N-Desalkylierung, Hydroxylierung und oxidative Desaminierung, z.T. gefolgt von Sulfat- bzw. Glucuronsäurekonjugation oder Acetylierung gebildet werden (s. Abb. 24).

---

* Strukturformeln s. S. 57

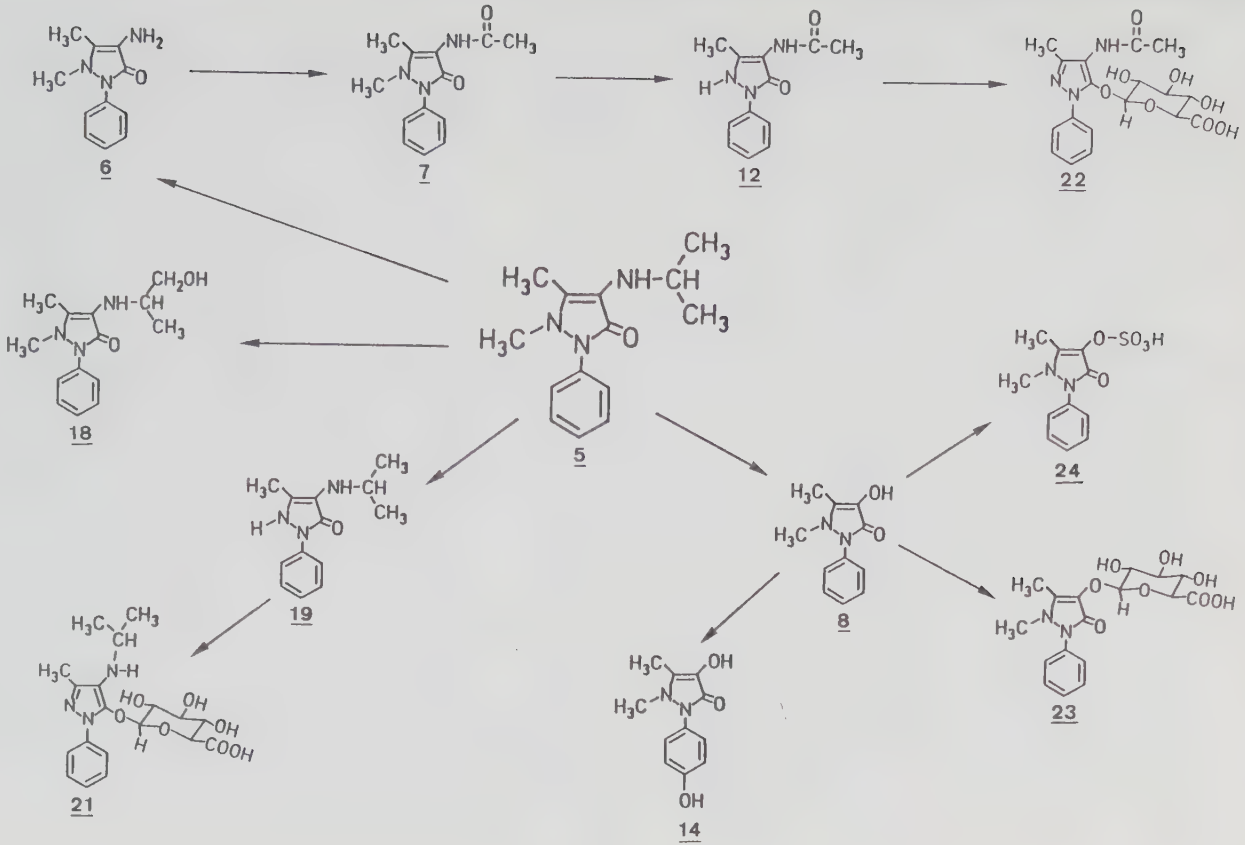


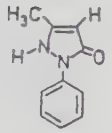
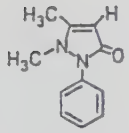
Abb. 24: Übersichtsschema - Metabolisierung des Isopropylaminophenazon (5) beim Menschen

2. METABOLISMUS ANDERER PYRAZOLINONE

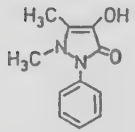
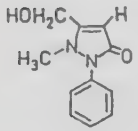
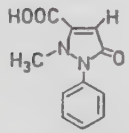
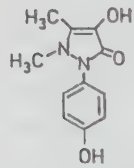
Das in Kapitel 1.2. beschriebene massenspektrometrische Verfahren der fraktionierten Verdampfung erschien geeignet, mit relativ geringem Zeitaufwand einen Überblick über die wichtigsten Phase-I-Metaboliten von Pharmaka zu gewinnen.
Die Anwendbarkeit dieser Methode sollte am Beispiel unterschiedlicher Pyrazolinonstrukturen (Phenazon (1), Dimethylaminophenazon (3) und Noramidopyrinmethansulfonat-Natrium (4)) geprüft werden, für die bereits detaillierte Untersuchungen zur Biotransformation beschrieben wurden[8-10].
Auch in diesen Studien wurde von freiwilligen Probanden jeweils 1 g der entsprechenden Verbindung peroral eingenommen und ein 24 h-Sammelurin gewonnen. Die Aufarbeitung des biologischen Materials erfolgte mit Hilfe der XAD-Extraktion (vgl. S. 129).
Die elementare Zusammensetzung jedes Molekülions wurde durch Hochauflösung bestimmt. Bei Ionen gleicher Summenformel wurde eine Differenzierung durch die MS/MS-Technik vorgenommen, wofür die Kenntnis unterschiedlicher Initialfragmentierungsschritte Voraussetzung war. Im folgenden werden die Ergebnisse dieser Untersuchung tabellarisch dargestellt. Die Auflistung der möglichen metabolischen Strukturen erfolgte nach Literaturangaben (vgl. S. 6-9).
Die Tabellen enthalten die Intensitäten der Molekülionen nach elektronenstoßinduzierter- und chemischer Ionisation in Prozent bezogen auf den entsprechenden base peak.

Bei Angaben von Summenformeln wurden diese durch Hochauflösung gesichert. Traten Peaks unterschiedlicher molekularer Zusammensetzung auf, so zeigen die Prozentangaben (hinter den Summenformeln) den relativen Anteil am Gesamtpeak.

2.1. Untersuchungen von Metabolitengemischen des Phenazon (1) durch fraktionierte Verdampfung

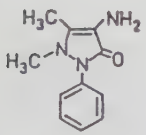
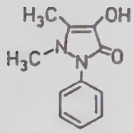
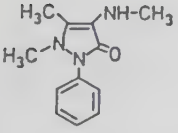
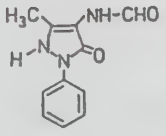
Metabolit (gem. Literatur)[8,9]	MS-Daten der fraktionierten Verdampfung	identifiziert nach frakt. Verdampfung
 16	EI: m/z 174 (4.7%) CI: m/z 175 (11.6%) $C_{10}H_{10}N_2O$ MS/MS: identisch mit authentischem Material	+
 1	EI: m/z 188 (3.9%) CI: m/z 189 (5.3%) $C_{11}H_{12}N_2O$ MS/MS: identisch mit authentischem Material	+

(Fortsetzung der Tabelle s. S. 60)

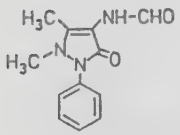
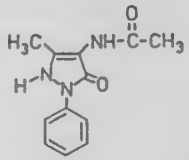
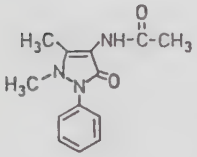
Metabolit (gem. Literatur)[8,9]	MS-Daten der fraktionierten Verdampfung	identifiziert nach frakt. Verdampfung
 8	EI: m/z 204 (14.6%) CI: m/z 205 (100.0%) basepeak $C_{11}H_{12}N_2O_2$ MS/MS: initial starke Carbonyleliminierung zu m/z 176; typische Fragmentierung des Metaboliten 8 (vgl. auch S. 29)	+
 15		nach MS/MS-Daten nicht eindeutig neben 8 identifizierbar
 17	EI: CI: nicht gefunden	–
 14	EI: m/z 220 (0.7%) CI: m/z 221 (4.5%) $C_{11}H_{12}N_2O_3$ MS/MS: identisch mit den auf S. 45 beschriebenen Daten	+

Tab. 3: MS-Daten der fraktionierten Verdampfung eines Metabolitengemisches des Phenazon (1) (Verdampfungstemperatur (EI, CI): 220° C)

2.2. Untersuchungen von Metabolitengemischen des Noramidopyrinmethansulfonat-Na (4) durch fraktionierte Verdampfung

Metabolit (gem. Literatur)[9,10]	MS-Daten der fraktionierten Verdampfung	identifiziert nach frakt. Verdampfung
 6	EI: m/z 203 (11.3%) CI: m/z 204 (18.3%) $C_{11}H_{13}N_3O$ MS/MS: identisch mit authentischem Material (vgl. auch S. 26)	+
 8	EI: nicht gefunden CI:	−
 9	EI: m/z 217 (2.3%) CI: m/z 218 (14.2%) $C_{12}H_{15}N_3O$ (10%) MS/MS: s. hierzu Ausführungen S. 62 f.	+
bisher nicht beschrieben	EI: m/z 217 (2.3%) CI: m/z 218 (14.2%) $C_{11}H_{11}N_3O_2$ (90%) MS/MS: s. hierzu Ausführungen S. 62 f.	 25

(Fortsetzung der Tabelle S. 62)

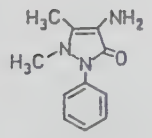
Metabolit (gem. Literatur) [9,10]	MS-Daten der fraktionierten Verdampfung	identifiziert nach frakt. Verdampfung
 11	EI: m/z 231 (3.9%) CI: m/z 232 (22.7%) $C_{12}H_{13}N_3O_2$ MS/MS: Das $M^{\pm}$ zeigt 1) eine für die Formylverbindung typische intensive Carbonylabspaltung zu m/z 203 (analog zu authent. Material) neben 2) einer Keteneliminierung zu m/z 189, beweisend für eine acetylierte Struktur und eine H_2O-Abgabe zu m/z 213, die für N-2-Norverbindungen spezifisch ist (vgl. S. 47 und 49).	+
bisher nicht beschrieben		 12
 7	EI: m/z 245 (17.1%) CI: m/z 246 (49.7%) $C_{13}H_{15}N_3O_2$ MS/MS: identisch mit authentischem Material (vgl. S. 23)	+

Tab. 4: MS-Daten der fraktionierten Verdampfung eines Metabolitengemisches des Noramidopyrinmethansulfonat-Na (4)
(Verdampfungstemperatur (EI, CI): 220° C)

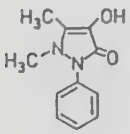
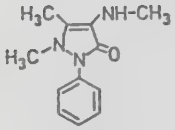
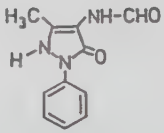
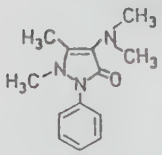
Das Ion der Masse m/z 217 bestand aus 2 Komponenten. Die exakte Massenbestimmung ergab zu 10% ein Ion der Zusammensetzung $C_{12}H_{15}N_3O$, das dem bereits bekannten Metaboliten 9 entsprach. Das MS/MS-Spektrum der Referenzsubstanz von 9 zeigte initial eine CH_3-Abspaltung zu m/z 202. Das MS/MS-Spektrum des Ionengemisches bei m/z 231 wies jedoch neben

m/z 202 ein Ion der Masse m/z 189 mit hoher Intensität auf, das der Verbindung 9 (aufgrund des Referenzspektrums) nicht zugeordnet werden konnte. Das Auftreten von m/z 189 läßt sich durch eine Carbonyleliminierung (ΔU 28) aus M^+ erklären. Die aus Hochauflösungsdaten ermittelte Summenformel für die verbleibenden 90% des Ions m/z 231 beschreibt das N-2-Norformylaminophenazon (25). Die entsprechende N-2-methylierte Verbindung 11, die als Referenzsubstanz vorlag, zeigte im MS/MS-Spektrum zu 70% aller Zerfälle eine Carbonyleliminierung (vgl. S. 62, Metabolit 11). Daher sollte m/z 189 eindeutig als Fragment von 25 zu klassifizieren sein. Darüber hinaus trat im MS/MS-Gemischspektrum auch die für N-2-Norverbindungen typische H_2O-Abspaltung (→ m/z 199) auf (vgl. hierzu auch S. 62, Metabolit 12).

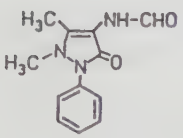
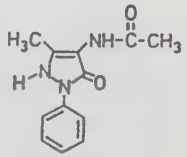
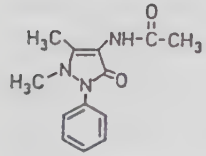
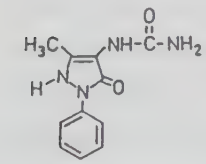
2.3. Untersuchungen von Metabolitengemischen des Dimethylaminophenazon (3) durch fraktionierte Verdampfung

Metabolit (gem. Literatur)[9,10]	MS-Daten der fraktionierten Verdampfung	identifiziert nach frakt. Verdampfung
 6	EI: m/z 203 (8.6%) CI: m/z 204 (11.8%) $C_{11}H_{13}N_3O$ MS/MS: identisch mit authentischem Material (vgl. S. 26)	+

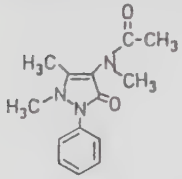
(Fortsetzung der Tabelle S. 64)

Metabolit (gem. Literatur)[9,10]	MS-Daten der fraktionierten Verdampfung	identifiziert nach frakt. Verdampfung
 8	EI: nicht gefunden CI:	–
 9	EI: m/z 217 (8.7%) CI: m/z 218 (14.3%) $C_{12}H_{15}N_3O$ (80%) MS/MS: initiale CH_3-Abspaltung zu m/z 202 (vgl. hierzu auch S. 62 f.)	+
bisher nicht beschrieben	EI: m/z 217 (8.7%) CI: m/z 218 (14.3%) $C_{11}H_{11}N_3O_2$ (20%) MS/MS: initiale Carbonyleliminierung zu m/z 189, H_2O-Abgabe zu m/z 199 (vgl. auch S. 62 f.)	 25
 3	EI: m/z 231 (6.9%) CI: m/z 232 (17.9%) $C_{13}H_{17}N_3O$ (29%) MS/MS: konsekutive Abspaltung der CH_3-Gruppen des C-4-Aminosubstituenten zu m/z 216 bzw. 201	+

(Fortsetzung der Tabelle S. 65)

Metabolit (gem. Literatur)[9,10]	MS-Daten der fraktionierten Verdampfung	identifiziert nach frakt. Verdampfung
 11	EI: m/z 231 (6.9%) CI: m/z 232 (17.9%) $C_{12}H_{13}N_3O_2$ (71%) MS/MS: Das M^+ zeigt 1) die für die Formylverbindung typische Carbonylabspaltung zu m/z 203 (analog zu authent. Material) neben 2) einer Keteneliminierung zu m/z 189, beweisend für eine acetylierte Struktur und eine H_2O-Abgabe zu m/z 213, die für N-2-Norverbindungen spezifisch ist (vgl. S. 47 und 49).	+
vgl. Ausführungen S. 66		 12
 7	EI: m/z 245 (12.3%) CI: m/z 246 (20.6%) $C_{13}H_{15}N_3O_2$ MS/MS: identisch mit authentischem Material (vgl. S. 23)	+
 13	EI: CI: nicht gefunden	–
in neuerer Literatur nicht mehr beschrieben		

(Forsetzung der Tabelle Seite 66)

Metabolit (gem. Literatur)[9,10]	MS-Daten der fraktionierten Verdampfung	identifiziert nach frakt. Verdampfung
 10	EI: nicht gefunden CI:	—

Tab. 5: MS-Daten der fraktionierten Verdampfung eines Metabolitengemisches des Dimethylaminophenazon (3) (Verdampfungstemperatur (EI, CI): 220° C)

Das Ion der Masse m/z 231 war ein Gemisch dreier Verbindungen, von denen zwei auch in ihren Hochauflösungsdaten übereinstimmten. Die beiden bereits bekannten Biotransformationsprodukte Dimethylaminophenazon (3) und Formylaminophenazon (11) ließen sich sowohl aufgrund unterschiedlicher elementarer Zusammensetzung als auch differenter MS/MS-Fragmentierungen der Einzelkomponenten unterscheiden. Das Vorliegen der Ionen m/z 213 und 189, die beim Zerfall von 3 und 11 nicht auftreten, setzt das Vorhandensein des N-2-Noracetylaminophenazon (12) voraus. Dieser Metabolit war bereits 1970 von Klug[27] beschrieben worden; Volz et al.[28] konnten jedoch zeigen, daß es sich bei dem von Klug isolierten Biotransformationsprodukt nicht um 12 sondern um 11 handelte. Das MS-Spektrum[29] des von Klug isolierten Produktes zeigte weder die für acetylierte Strukturen typische Ketenabspaltung noch die N-2-Norverbindungen charakterisierende H_2O-Abgabe, sondern war mit dem EI-Spektrum von 11 identisch. Aus den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchungen, die die strukturspezifischen Fragmentierungen

beider Substanzen berücksichtigen, ist jedoch die renale Ausscheidung von sowohl 11 als auch 12 als gesichert anzusehen.

2.4. Wertende Zusammenfassung

Die Ergebnisse haben gezeigt, daß die Kombination von fraktionierter Verdampfung, Hochauflösung und MS/MS-Technik eine sinnvolle Methode des Metabolitenscreening darstellt. Dies gilt insbesondere, wenn die massenspektrometrische Charakterisierung strukturanaloger Modellsubstanzen als zusätzliches Kriterium hinzugezogen wird.
Metaboliten, die nur zu geringem Anteil gebildet werden, lassen sich allerdings in Gemischspektren nur schwer erfassen (z.B. Identifizierung von Hydroxyphenazon (8) als Biotransformationsprodukt von Dimethylaminophenazon (3)). Andererseits kann die aufarbeitungsbedingte Artefaktbildung weitestgehend vermieden werden, wenn XAD-Extrakte der entsprechenden Harne nach diesem Verfahren direkt massenspektrometrisch analysiert werden. Die beiden Farbstoffe Rubazon- (26) und Methylrubazonsäure (27) konnten in den vorliegenden Untersuchungen weder als Metaboliten des Dimethylaminophenazon (3) noch des Noramidopyrinmethansulfonat-Na (4) gefunden werden, obwohl beide Strukturen eindeutig MS-

analytisch zu identifizieren sind (vgl. S. 70).
Zusätzlich gestattet eine derartige Analytik, durch Langzeitmessung derselben Probe die Bildung von Sekundär- sowie die gleichzeitige Zersetzung der Primärprodukte zu kontrollieren.
Die besondere Bedeutung dieser neuen Kombination verschiedener analytischer Techniken für Biotransformationsstudien wird dadurch bewiesen, daß mit N-2-Noracetylaminophenazon (12) und N-2-Norformylaminophenazon (25) zwei weitere, bislang unbekannte Metabolisierungsprodukte von 3 und 4 strukturell gesichert werden konnten.
Im Hinblick auf konventionelle GC/MS-Untersuchungen von Metaboliten [5] läßt sich anmerken, daß der GC/MS-Analyse häufig Derivatisierungsschritte vorangehen, die z.T. nur einen indirekten Nachweis primär vorhandener Strukturen erlauben. Ferner können thermische Zersetzungen zu unkontrollierbaren Ergebnissen führen. Diese werden bei der temperaturabhängigen fraktionierten Verdampfung (20° - 400° C) vermieden bzw. erkannt.

3. UNTERSUCHUNGEN ZUR BILDUNG VON RUBAZONSÄURE (26) UND METHYLRUBAZONSÄURE (27)

Das Auftreten zweier farbiger Substanzen, der Rubazonsäure (26) und Methylrubazonsäure (27) in den renalen Exkreten nach Einnahme bestimmter Aminopyrazolinone ist seit langem Gegenstand intensiver Untersuchungen[22,23,30,31]. Von besonderem Interesse ist die Frage, ob es sich bei diesen Verbindungen um echte Metabolisierungsprodukte oder sekundär gebildete Artefakte handelt.

Im Rahmen der in Kapitel 1. und 2. beschriebenen Biotransformationsstudien wurden detaillierte vergleichende Untersuchungen zum Stoffwechsel von Isopropylaminophenazon (5), Noramidopyrinmethansulfonat-Na (4) und Dimethylaminophenazon (3) durchgeführt. Die angegebenen Aufarbeitungs- und Nachweisverfahren ermöglichten (unter Vermeidung der Artefaktbildung) die Identifizierung genuiner metabolischer Strukturen. Unter diesen Bedingungen konnten 26 und 27 in keinem Fall als originäre Ausscheidungsformen von 3, 4 und 5 gefunden werden.

Wurden Harnproben nach peroraler Applikation von 5 alternativ (der konventionellen Aufarbeitungsmethodik folgend) nach saurer bzw. enzymatischer Hydrolyse und Chloroformextraktion (vgl. S. 128) dünnschichtchromatographisch analysiert, zeigten sich jedoch zwei Farbstoffe. Nach Anreicherung und Isolierung (s. S. 128) wurden beide Substanzen massenspektrometrisch (EI) untersucht. Die MS-Spektren beider Produkte waren identisch mit denen der Referenzsubstanzen 26 und 27 (s. Abb. 25).

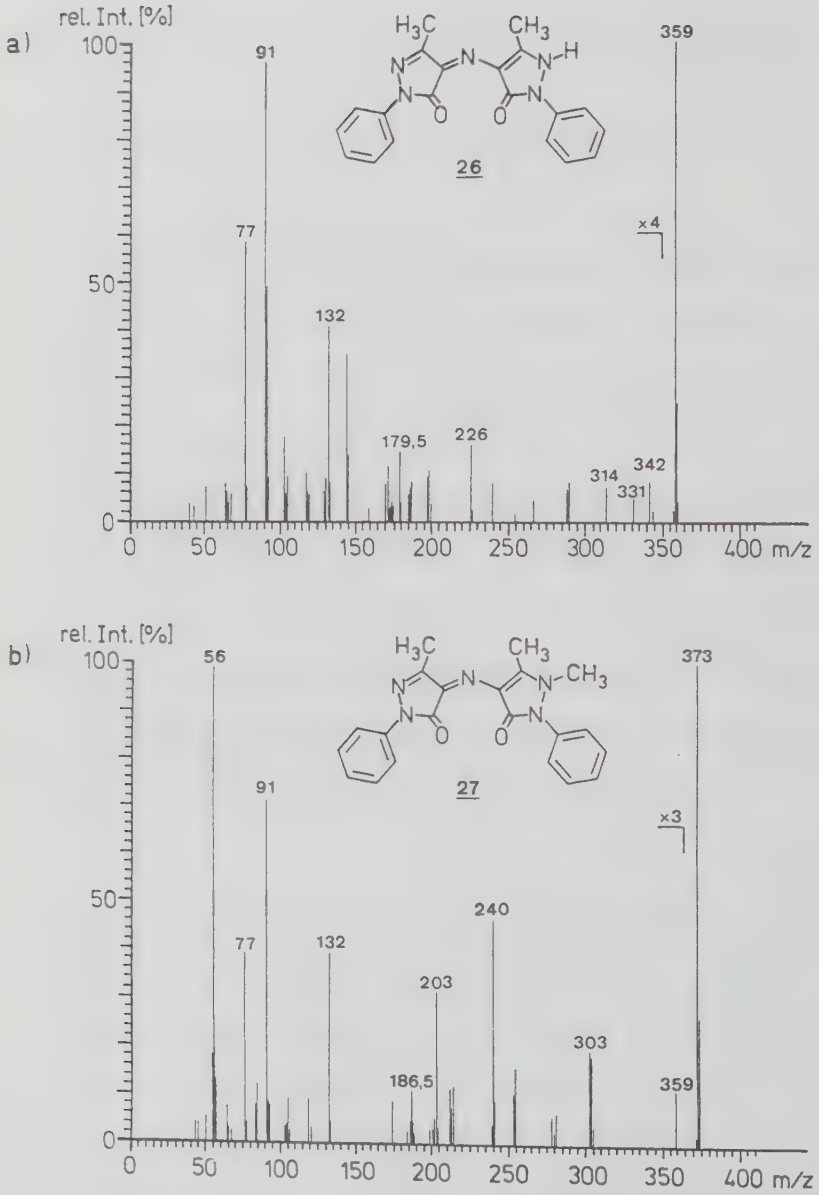


Abb. 25: EI-Spektren
a) Rubazonsäure (140° C, 80 eV)
b) Methylrubazonsäure (150° C, 80 eV)

Interpretation:

In den MS-Spektren von 26 und 27 tritt der jeweilige Molpeak (m/z 359 bzw. m/z 373) als base peak auf. Die hohe relative Intensität der M^{+}-Ionen im Vergleich zu monomeren Pyrazolinonstrukturen erklärt sich aus der Stabilisierung durch das konjugierte System. Auffällig ist das Auftreten von M^{2+}-Ionen bei m/z 179.5 bzw. m/z 186.5. Derartige Ionen treten bei heteroatomhaltigen (N, O, S) aromatischen Systemen, bei denen das Molekülion eine hohe Stabilität aufweist, bevorzugt auf. Aus solchen Strukturen ist die Abspaltung eines zweiten Elektrons aus den nicht-bindenden Molekülorbitalen aufgrund der benötigten geringeren Energie begünstigter als die Fragmentbildung. Dies wird im vorliegenden Fall durch die relativ geringe Anzahl auftretender Fragmente bestätigt.
Das Ion m/z 56 (C_3H_6N) kann auch hier zur eindeutigen Difrenzierung einer N-2,C-3-dimethylierten Substanz herangezogen werden, da dieses Fragment nur im MS-Abbau von 27 auftritt.

Basierend auf diesen Informationen sollte die Bildung von 26 und 27 unter gleichen Bedingungen auch bei 3 und 4 untersucht werden. Nach abendlicher Einnahme von jeweils 1 g Arzneistoff wurden zunächst die 8 - 10 h p.appl. ausgeschiedenen Morgenharne geprüft. Die Identifizierung von 26 und 27 in den Untersuchungsmaterialien von 3, 4 und 5 war nur möglich nach:

1) saurer Hydrolyse bei pH 1, 100° C, 15 min (s.S.128),
2) enzymatischer Spaltung durch β-Glucuronidase/Arylsulfatase bei 37° C, 3 h (s.S. 128) und
3) längerer Tageslichtexposition (bis zu 3 d) bei Raumtemperatur.

Des weiteren wurde beobachtet, daß sich Harne nach Einnahme von Dimethylaminophenazon (3) auffällig schnell - auch ohne weitere Vorbehandlung - verfärbten, so daß hier bereits die direkten Chloroformextrakte (s. S.127f.) geringe Mengen beider Farbstoffe enthielten. Zum eindeutigen Nachweis der sekundären Bildung von 26 und 27 wurde ein Morgenharn unverzüglich nach Probengewinnung extrahiert und analysiert. Beide Farbstoffe konnten nicht gefunden werden.

Harnproben nach Applikation von Noramidopyrinmethansulfonat-Na (4) wiesen im Vergleich zu 3 und 5 durchweg geringere Mengen an 26 und 27 auf. Aus diesem Grund wurden für weitere Untersuchungen auch Urinproben späterer Versuchszeiträume (10 - 24 h p.appl.) nach Hydrolyse geprüft. Neben 27 trat nunmehr im verstärkten Ausmaß auch 26 auf.

Das zeitlich und mengenmäßig unterschiedliche Auftreten der Artefakte Rubazon- (26) und Methylrubazonsäure (27) in Harnen nach Aminopyrazolinon-Gabe könnte durch eine differente Ausscheidungskinetik der für die Bildung erforderlichen Präcursoren bedingt sein.

Mit Blick auf die Entstehung von 26 und 27 erscheint das Auffinden von N-2-Noracetylaminophenazon (12) bzw. N-2-Norformylaminophenazon (25) als Metaboliten von 3, 4 und 5 interessant. Hänsel et al.[23] sehen in 12 einen wichtigen Vorläufer der beiden Farbstoffe als Artefakte von 3: Die Hydrolyse des N-2-Noracetylaminophenazon (12) führt zur Bildung von N-2-Noraminophenazon (29). Diese Verbindung wird durch Luftoxidation über das Imin 30 zu 1-Phenyl-2,3-dimethylpyrazolidin-4,5-dion (31) umgewandelt, welches entweder mit weiterem 29 zu Rubazonsäure (26) oder mit Aminophenazon (6) zu Methylrubazonsäure (27) reagiert. Diese Theorie ist formelmäßig in Abb. 26 auf S. 74 dargestellt.

Eigene Befunde lassen sich zwanglos unter Erweiterung der dargestellten Hypothese erklären. Einerseits könnte die saure Hydrolyse (pH 1) von 12 und 25 zu N-2-Noraminophenazon (29) führen. Andererseits treten beide Farbstoffartefakte auch unter den Bedingungen der enzymatischen Hydrolyse (pH 6.2) auf. Folglich sollten die N-2-Norprodukte als Konjugate ausgeschieden werden, die sowohl sauer als auch enzymatisch spaltbar sind. Anstelle der entsprechenden Phase-I-Strukturen konnten nach hydrolytischer Vorbehandlung der Harnproben jedoch ausschließlich 26 bzw. 27 nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu lassen sich bei der fraktionier-

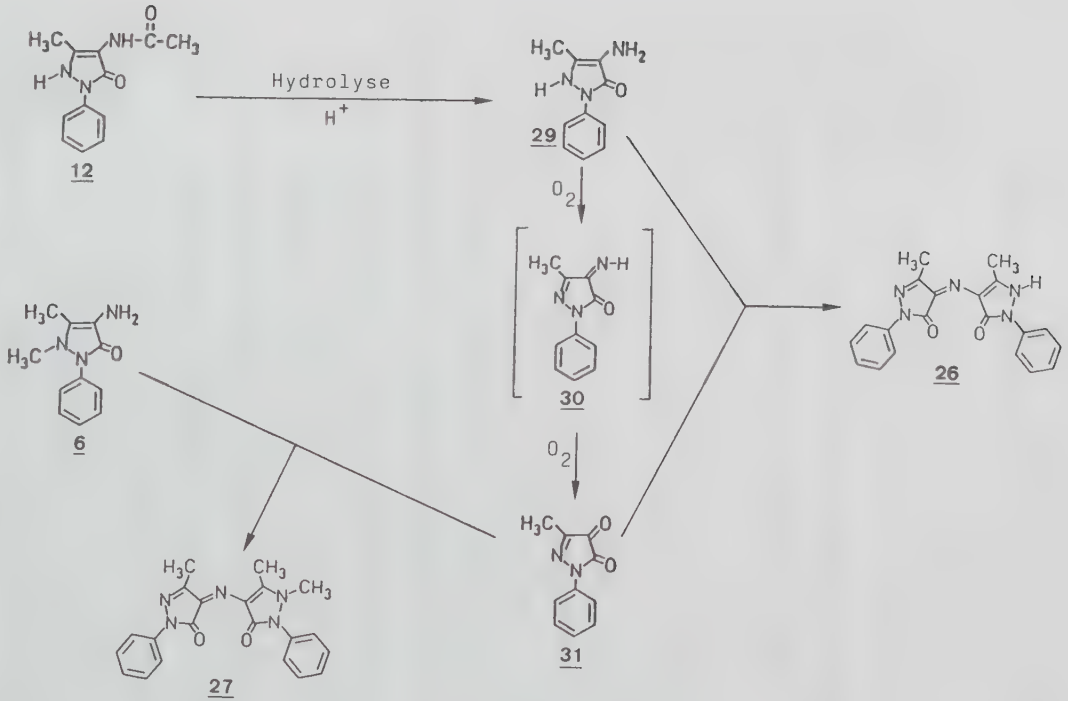


Abb. 26: Theorie zur Entstehung von Rubazon- (26) und Methylrubazonsäure (27) nach Hänsel[23]

ten Verdampfung der intakte Konjugate enthaltenden XAD-Extrakte von 3, 4 und 5 die Metabolisierungsprodukte 12 und 25 eindeutig identifizieren. Somit scheint die Konjugation, z.B. mit Glucuronsäure, einen stabilisierenden Einfluß auf N-2-Noraminopyrazolinone zu haben; die freien Verbindungen zeigen dagegen offensichtlich die Tendenz, durch Sekundärreaktionen chemisch stabile Strukturen zu bilden.
Das Auftreten von 26 und 27 nach längerem Stehenlassen der Proben am Tageslicht, das für Dimethylaminophenazon (3) auch von Voigt[22] beobachtet wurde, müßte folglich durch eine partielle zeit-, licht- bzw. temperaturabhängige Spaltung von Konjugaten bedingt sein. Am Beispiel von Glucuroniden anderer Pharmaka konnte bereits eine derartige Instabilität unter vergleichbaren Bedingungen nachgewiesen werden[32,33]. Im Rahmen orientierender Vorversuche wurden bezüglich der Konjugate des Hydroxyphenazon (8) (als Metaboliten des Isopropylaminophenazon (5)) Hinweise für ein ähnliches Verhalten gefunden: Harne, die unter den Konditionen der enzymatischen Hydrolyse (pH 6.2, 37° C) jedoch ohne Enzymzusatz behandelt wurden, enthielten im Gegensatz zu Nativharn freies Hydroxyphenazon (8).
Die Bildung der Methylrubazonsäure (27) erfordert neben einer N-2-Norpyrazolinonstruktur einen N-2-methylierten Aminopyrazolinonreaktanden. Für Dimethylaminophenazon (3) konnte Voigt[22] die ausschließliche Beteiligung von Aminophenazon (6) als N-2-methylierter Komponente von 27 beweisen. Aufgrund der ähnlichen Metabolisierung des Noramido-

pyrinmethansulfonat-Na (4) dürfte 6 hier dieselbe Bedeutung haben. Bei den Untersuchungen zur Biotransformation des Isopropylaminophenazon (5) konnte 6 - wenn überhaupt - nur in geringen Mengen gefunden werden, in keinem Fall jedoch nach hydrolytischer Vorbehandlung der Proben. Konnte 6 in Direktextrakten (s. S.127f.) nachgewiesen werden, zeigten die hydrolysierten Proben beide Farbstoffartefakte; im gegenteiligen Fall wurde nur Rubazonsäure (26) identifiziert. Originär vorhandenes Aminophenazon (6) sollte folglich quantitativ bei der Methylrubazonsäurebildung verbraucht worden sein.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß 26 und 27 keine Metaboliten von 3, 4 und 5 sind. Die beiden N-2-Noraminopyrazolinonstrukturen 12 bzw. 25 respektive deren Konjugate sind mit hoher Wahrscheinlichkeit als Präcursoren der Farbstoffartefakte anzusehen. Bei der Bildung von 27 fungiert Aminophenazon (6) als N-2-methylierte Aminopyrazolinonkomponente.

4. ANALYTIK UND PHARMAKOKINETIK DES ISOPROPYLAMINOPHENAZON (5) UND AUSGEWÄHLTER BIOTRANSFORMATIONSPRODUKTE

Nachdem qualitativ umfassende Erkenntnisse zur Metabolisierung von 5 gewonnen worden waren, sollte versucht werden, mit modernen analytischen Verfahren (GC, HPLC) Methoden zur Bioanalytik des Wirkstoffes und seiner Abbauprodukte zu erarbeiten. Ziel dieser Versuche war es, im Rahmen orientierender Untersuchungen, Isopropylaminophenazon (5) pharmakokinetisch bezüglich der Dispositionsparameter im Plasma und der renalen Ausscheidungsdaten zu charakterisieren und auf der Basis von Literaturdaten mit anderen therapeutisch eingesetzten Pyrazolinonderivaten zu vergleichen. In die Studien zur renalen Eliminationskinetik sollten jedoch nur diejenigen Biotransformationsprodukte einbezogen werden, bei denen eine ausreichende Stabilität der Phase-I-Strukturen gewährleistet war und Referenzsubstanzen vorlagen.

4.1. Analytik des Isopropylaminophenazon (5)

Zur quantitativen Bestimmung von 5 waren bislang nur UV-spektralphotometrische Verfahren nach vorheriger Flüssig-Flüssig-Extraktion beschrieben (vgl. S. 4). Die Spezifität und Selektivität dieses Verfahrens ist allerdings vergleichsweise gering und entspricht nicht mehr modernen analytischen Erfordernissen.

Aufgrund der chemischen Struktur des Wirkstoffes: a) keine stark polaren Funktionen und drei Stickstoffatome sowie b) ein aromatisches Ringsystem sollte die analytische Bestimmung

sowohl mittels Gaschromatographie (GC) ohne vorherige Derivatisierung unter Verwendung eines Stickstoff-Flammenionisationsdetektors (N-FID) als auch mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)bei UV-Detektion möglich sein.
Beide Alternativen wurden vergleichend getestet.

4.1.1. GC-Analytik des Isopropylaminophenazon (5)

Die Anwendbarkeit dieser analytischen Methode, die die Verdampfbarkeit der Substanz zur Voraussetzung hat, wurde am Beispiel gepackter Säulen mit verschiedenen Füllmaterialien für den Arzneistoff 5 untersucht.
Auch bei optimierten Temperaturbedingungen (Injektor-, Säulen- und Detektortemperatur) waren folgende stationäre Phasen aufgrund langer Retentionszeiten von 5 und starkem Peaktailing zur quantitativen Bestimmung ungeeignet:
5% OV-1 auf Gas Chrom Q, 3% OV-17 auf Gas Chrom Q und 3% QF-1 auf Gas Chrom G.
Bei einer Belegung mit 3% OV-25 auf Gas Chrom G konnte 5 nicht unzersetzt chromatographiert werden. Im Gegensatz dazu war sowohl die Belegung von Gas Chrom Q mit 5% SE-30 als auch mit 1% Carbowax-20 M analytisch einsetzbar. Zum quantitativen Nachweis von 5 wurde in den weiteren Versuchen eine gepackte Glassäule (Länge: 2 ft, Innendurchmesser: 2 mm) mit dem Trägermaterial Gas Chrom Q (80 - 100 mesh) mit einer Mischbelegung von 0.5% Carbowachs-20 M und 0.5% SE-30 verwendet.
Die optimierten apparativen Parameter waren:

Temperaturen: Injektor: 300° C, Säule: 175° C (isotherm), Detektor: 300° C

Trägergas: N_2, Strömungsgeschwindigkeit: 28 ml/min, Vordruck: 80 kPa

Detektor: N-FID

Brenngase: H_2, Vordruck: 80 kPa, synthetische Luft, Vordruck: 0.3 MPa

Injektionsvolumen: 1 µl

(vgl. zu den apparativen Bedingungen auch S. 123)

Ein Gaschromatogramm von 5 unter diesen Bedingungen ist in Abb. 27 auf S. 80 dargestellt.

Die absolute Nachweisgrenze des GC-Systems lag bei 1 ng 5/Einspritzung. Die Detektor-Response war im Bereich von 5 - 500 ng/1 µl linear. Der Variationskoeffizient der Einspritzung einer definierten methanolischen Standardlösung (80 ng 5/µl) betrug 11.4% (n=10). Zur Optimierung der analytischen Bedingungen sollte daher ein geeigneter interner Standard gesucht werden, der sowohl eine Kontrolle der Qualität der der Analyse vorangehenden Extraktion (s. S.131f.)als auch vom Injektionsvolumen unabhängige, quantitativ richtige und reproduzierbare Ergebnisse gewährleistet. Die chemische Struktur eines internen Standards sollte möglichst ähnlich der der zu analysierenden Substanz sein, so daß beide Verbindungen unter vergleichbaren Bedingungen chromatographiert werden können.

Unter diesem Aspekt wurde Dimethylaminophenazon (3) ausgewählt. Dieses Pyrazolinon wird a) nicht im Rahmen der Metabolisierung von 5 gebildet und enthält b) wie 5 drei Stickstoffatome, die mittels N-FID nachweisbar sein sollten. Als zweite ebenfalls stickstoffhaltige Verbindung, die allerdings keine strukturelle Ähnlichkeit zu 5 aufweist, wurde 4-Ethoxyacetanilid geprüft.

Unter den beschriebenen GC-Bedingungen wiesen die Substanzen folgende Retentionszeiten auf: 5 = 4.2 min, 3 = 2.4 min und 4-Ethoxyacetanilid = 3.0 min. Da die Trennung von 3 und 5 ausreichend war (s. Abb. 27), wurde 3 als interner Standard verwendet. Der Response-Faktor des N-FID für Isopropylaminophenazon (5) bezogen auf den internen Standard betrug 1.4 (vgl. S. 130f.).

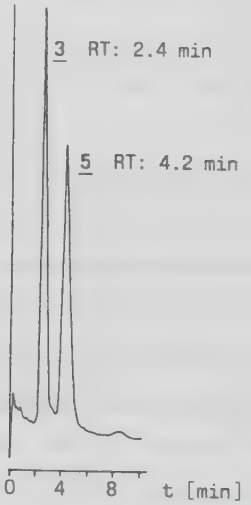


Abb. 27: Gaschromatogramm von 3 und 5
GC-Bedingungen s. S. 79
Konzentrationen: pro 1 µl
157 ng 5 und 101 ng 3

Abschließend wurde die Stabilität des Wirkstoffes 5 in den verwendeten Standardlösungen in Abhängigkeit von Lösungsmittel, Temperatur und Tageslicht geprüft. Lösungen von 5 in Toluol, n-Hexan bzw. n-Heptan (1 mg 5/ml) zeigten auch ohne Belichtung bereits nach 24 h ein gaschromatographisch nachweisbares einheitliches Zersetzungsprodukt. Bei Verwendung von Methanol, Chloroform und Ethylacetat war diese Instabilität auch bei Tageslichtexposition (24 h) bzw. 3-stündigem Erwärmen bis max. 70° C nicht detektierbar (s. auch S. 131).

4.1.2. Extraktionsverfahren für Isopropylaminophenazon (5) aus biologischem Material (Harn, Serum und Speichel)

Nachdem eine gaschromatographische Analysenmethode zum Nachweis von 5 etabliert war, wurden mittels verschiedener biologischer Materialien unterschiedliche Extraktionsvarianten vergleichend untersucht und bewertet. Zur Bestimmung von Wiederfindungsraten wurden Harn-, Serum- und Speichelproben von medikationsfreien Probanden gewonnen und mit definierten Mengen des Wirkstoffes 5 und jeweils einer konstanten Menge des internen Standards 3 versetzt (s. S. 131f.). Bei pH 11 wurde direkt mit Chloroform extrahiert. Alternativ wurden die Proben mit KCl-Lösung versetzt , der pH-Wert entsprechend eingestellt, die wässrigen Phasen auf Extrelut®-Fertigsäulen aufgebracht und nach einer Äquilibrierungszeit mit $CHCl_3$ eluiert (s. S. 132). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tab. 6 zusammengefaßt.

Biolog. Material	pH	Extraktionverfahren	Wiederfindung [%]	n
Urin	11.0	flüssig-flüssig 1x	42.2 ± 0.90	2
		flüssig-flüssig 2x	70.6 ± 4.02	6
		flüssig-flüssig 3x	81.7 ± 5.08	12
Urin	4.0	Extrelut®	27.5 ± 1.86	4
	7.4	Extrelut®	95.2 ± 5.08	9
	9.0	Extrelut®	92.4 ± 5.49	13
	11.0	Extrelut®	97.4 ± 1.02	7
Serum	11.0	Extrelut®	95.6 ± 3.42	11

Tab. 6: Wiederfindungsraten der Extraktion von 5 aus biolog. Material

Speichelproben wurden nur bei pH 11 mittels Extrelut®-Säulen extrahiert; die Wiederfindung war mit < 90% etwas geringer.

Eine nahezu quantitative Extraktion bzw. Elution von 5 war also im pH-Bereich 7.4 - 11.0 möglich. Die Verwendung von Extrelut®-Fertigsäulen war der Flüssig-Flüssig-Extraktion überlegen, da 1) nach einmaliger Elution der Wirkstoff quantitativ in der $CHCl_3$-Phase enthalten war (im Vergleich zur 3-maligen Flüssig-Flüssig-Extraktion) und 2) die störende Emulsionsbildung vermieden wurde.
Die erhaltenen Extrakte wiesen eine genügende Abtrennung physiologischer Begleitsubstanzen auf, so daß im Retentionsbereich von Isopropylaminophenazon (5) und Dimethylaminophenazon (3) keine störenden Peaks auftraten.

4.1.3. HPLC-Analyse des Isopropylaminophenazon (5)

vgl. 4.2.2., S. 84ff.

4.2. Analytik ausgewählter Biotransformationsprodukte von 5

Von den Metaboliten des Isopropylaminophenazon (5) waren aufgrund der in Kapitel 1 beschriebenen Erkenntnisse nur Aminophenazon (6), Acetylaminophenazon (7) und Hydroxyphenazon (8) als Phase-I-Strukturen genügend stabil, um quantitativ analysiert zu werden. Auch lagen nur von diesen Verbindungen Referenzsubstanzen vor. Noracetylaminophenazon (12), Norisopropylaminophenazon (19) und Dihydroxyphenazon (14) konnten im Rahmen des DC-Screening (s. S. 14ff.) nicht nachgewiesen, jedoch bei der fraktionierten Verdampfung (s. S. 39ff.) eindeutig identifiziert werden.

Dieses Resultat zeigte, daß die genannten Verbindungen nach Freisetzung aus ihren Konjugaten instabil sind. Für 19 wurde dieses Phänomen ausführlich im Zusammenhang mit der Farbstoffbildung (s. S. 69ff.) diskutiert. Die Zersetzung von 14 ist bereits detailliert untersucht und in der Literatur beschrieben worden[24,34,35,36].

Eine quantitative Bestimmung von 12, 14 und 19 wäre folglich nur nach präparativer Darstellung der Reinstoffe bzw. ihrer Konjugate und nach Entwicklung analytischer Verfahren für diese hydrophilen Substanzen möglich. Sowohl die Synthese wie auch die bioanalytische Bestimmung von Glucuronsäure- bzw. Sulfatkonjugaten ist bisher aufgrund chemisch-analytischer Schwierigkeiten nur in wenigen Fällen gelungen [37, 38, 39, 40]. Daher wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf derartige Untersuchungen verzichtet.

4.2.1. GC-Analyse ausgewählter Biotransformationsprodukte

Nach Möglichkeit sollte ein analytisches Verfahren entwickelt werden, das den simultanen Nachweis aller 4 zu bestimmenden Pyrazolinonderivate gestattet. Daher wurde versucht, mit dem für Isopropylaminophenazon (5) optimierten GC-System auch 6, 7 und 8 quantitativ zu analysieren.

Aminophenazon (6) und Acetylaminophenazon (7) konnten unter gleichen GC-Bedingungen wie 5 chromatographiert werden. Bei isothermer Analyse (vgl. S. 79) waren die Retentionszeiten von 6 und 7 relativ lang. Um den Zeitbedarf der Einzelanalyse bei ausreichender Trennung der Komponenten zu optimieren, wurde ein Temperaturprogramm gewählt (s. Abb.28, S. 84).

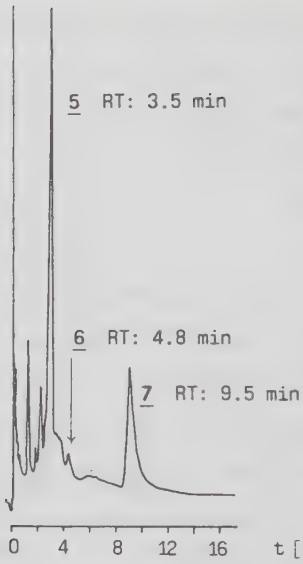


Abb. 28: Gaschromatogramm eines Extrelut®-Harnextraktes ($CHCl_3$)
GC-Bedingungen:
Temperaturprogramm: 175°-220° C
6° C/min
Injektor u. Detektor: 250° C
sonst. Bedingungen s. S. 79

Hydroxyphenazon (8) konnte weder underivatisiert noch nach Acetylierung[64] (auch unter veränderten Temperaturbedingungen) nachgewiesen werden, obwohl auch diese Substanz aufgrund der N-Atome des Pyrazolinonsystems im N-FID detektierbar sein sollte.

4.2.2. HPLC-Analyse des Isopropylaminophenazon (5) und ausgewählter Biotransformationsprodukte

Die HPLC ist eine moderne analytische Methode, die die quantitative Bestimmung ohne die bei der GC-Analyse auftretende thermische Belastung ermöglicht. Darüber hinaus ist für dieses Verfahren die Verdampfbarkeit der zu analysierenden Substanz (im Ggs. zur GC) keine Voraussetzung. Ein weiterer

Vorteil besteht in der Einspritzbarkeit vergleichsweise größerer Proben- bzw. Extraktvolumenanteile (GC-Analyse: i.a. 1 µl von minimal 10 µl, HPLC-Analyse: 10 - 1000 µl). Darüber hinaus gestattet die Verwendung polarer mobiler Phasen (Methanol/Wasser, Acetonitril/Wasser) bei der Reversed-Phase(RP)-HPLC ggf. die direkte Probenaufgabe (ohne vorherige Extraktion) von z.B. Harn und wäßrigen Überständen denaturierter, zentrifugierter Plasmaproben. Dieses Vorgehen verringert den Aufwand der Probenbearbeitung entscheidend und vermeidet extraktionsbedingte Substanzverluste.
Die Detektierbarkeit der Pyrazolinone war aufgrund der UV-Absorption des konjugierten Systems gewährleistet.

Für die Entwicklung eines HPLC-Systems wurden Reversed-Phase-Säulen und als Eluens verschiedene Methanol-Wasser-Mischungen unter isokratischen Bedingungen eingesetzt (vgl. S. 124). Gleiche stationäre Phasen (RP 18) identischer Korngröße (5 µm) verschiedener Hersteller (Lichrosorb®, Fa. Merck; Spherisorb®, Fa. Bischoff; Nucleosil®, Fa. Macherey & Nagel) wiesen im Hinblick auf die Trennung der untersuchten Substanzen z.T. erhebliche Unterschiede auf. Im Rahmen der Versuchsreihe wurden optimale Resultate bei Verwendung einer Nucleosil® RP-18-Säule (5 µm, 250 x 4.6 mm) erzielt. Mit einem Fließmittelgemisch gleicher Anteile von Wasser und Methanol (Fluß: 0.9 ml/min) wurden Isopropyl-

aminophenazon (5) mit einer Retentionszeit von 13.3 min, Dimethylaminophenazon (3) (interner Standard) nach 10.0 min und Acetylaminophenazon (7) nach 4,1 min eluiert (s. Abb. 29 a). Aminophenazon (6) und Hydroxyphenazon (8) unterschieden sich in ihrem chromatographischen Verhalten unter den gewählten Bedingungen nur geringfügig; die Retentionszeiten betrugen 5.9 min (6) bzw. 6.1 min (8). Um 6 und 8 basisliniengetrennt chromatographisch nachweisen zu können, mußte der Wasseranteil im Gemisch auf 60% erhöht werden; 6 wurde nach 9.6 min, 8 nach 10.3 min eluiert. Für die ausschließliche Bestimmung von 5 wurde eine Fließmittelmischung von Wasser und Methanol im Verhältnis 3:7 verwendet; Die Retentionszeit von 5 betrug 5.1 min (s.Abb. 29 b). (HPLC-Bedingungen: s. S. 124)

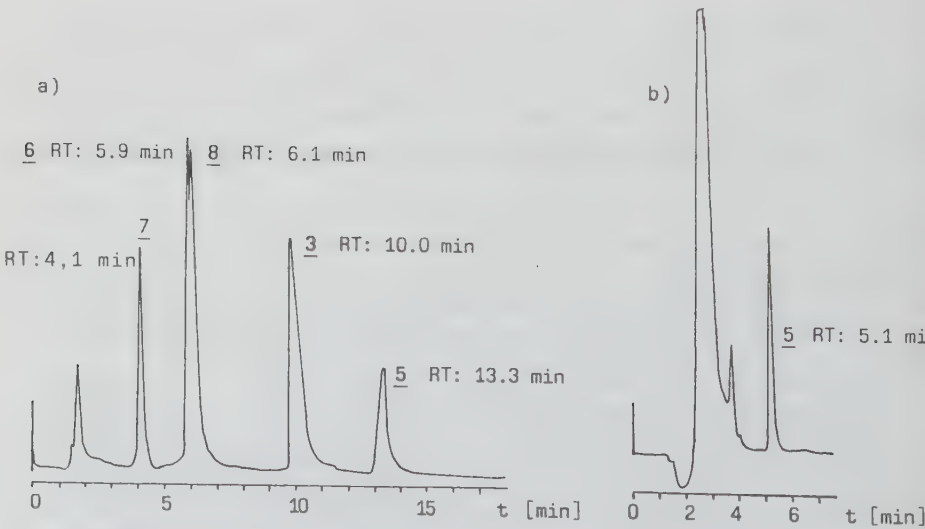


Abb. 29: HPLC-Chromatogramme (Bedingungen s. S. 124)

a) Reinstoffmischung von 3, 5, 6, 7 und 8 MeOH/H_2O (50:50, v/v)

b) Direkteinspritzung von denaturiertem Plasma mit 12.1 µg 5/ml; MeOH/H_2O (70:30, v/v)

Auch mittels HPLC konnte kein Analysensystem zur simultanen bioanalytischen Bestimmung aller 4 zu untersuchenden Pyrazolinonderivate erarbeitet werden, jedoch war Hydroxyphenazon (8) nunmehr quantifizierbar.

4.2.3. HPLC-Analyse biologischer Proben

Vor Beginn der pharmakokinetischen Untersuchungen wurde zur vergleichenden Bewertung von GC- und HPLC-Verfahren getestet, ob bei Anwendung der HPLC-Methode die Probenaufarbeitung durch Direkteinspritzung vereinfacht werden konnte (s. S. 85). Exemplarisch wurde geprüft, ob Plasmaproben nach Proteindenaturierung (mit Acetonitril) und Zentrifugation bzw. Speichel- und Harnproben nach Verdünnung (mit Methanol) direkt analysiert werden können (s. S. 133). Die Analyse von Plasma- und Speichelproben zeigte, daß keine störenden "Physiologie"-Peaks im Retentionsbereich der nachzuweisenden Verbindungen auftraten. Aufgrund des durch Zusatz von Methanol oder Acetonitril bewirkten Verdünnungseffektes lag die Nachweisgrenze für 5, 6, 7 und 8 bei ca. 1 - 3 µg/ml. Leerharnproben konnten nur nach starker Verdünnung (10 - 100-fach) direkt injiziert werden; eine interferenzfreie, quantitativ richtige Analyse der Pyrazolinone war aufgrund von Untergrundpeaks nicht gewährleistet, die Nachweisgrenze verdünnungsbedingt vergleichsweise hoch. Daher wurden Harnproben im folgenden stets mit Chloroform über Extrelut®-Säulen eluiert; dabei war eine ausreichende "Sauberkeit" der konzentrierten Eluate gewährleistet. Die Wiederfindungsraten für 5 unter diesen Bedingungen sind

bereits auf S. 81 beschrieben; für 6 und 7 wurde aufgrund der chemischen Struktur und bekannter Literaturdaten[41,42] bei pH ≥ 9 ebenfalls eine quantitative Elution vorausgesetzt. Hydroxyphenazon (8) wurde nach enzymatischer Hydrolyse mittels Chloroform bei pH 4.0 über Extrelut®-Säulen eluiert; auch hier waren keine Extraktionsverluste zu erwarten[43]. Bei der Direkteinspritzung nach Eiweißfällung (Plasma) bzw. nach Verdünnung (Speichel) traten keine Substanzverluste auf.

4.3. Untersuchungen zur Pharmakokinetik des Isopropylaminophenazon (5) beim Menschen

Da für diese Untersuchungen kein größeres Probandenkollektiv zur Verfügung stand, wurden die pharmakokinetischen Parameter im Fall der Plasma- und Speichelkinetik mit n = 1 und bei der Eliminationskinetik mit n = 3 bestimmt. Die Studien hatten somit nur orientierenden Charakter.

Es wurden jeweils 870 mg Isopropylaminophenazon (5) als wässrige Lösung (1 g 5-HCl in 50 ml Wasser) peroral eingenommen. Blutproben wurden aus der linken Cubitalvene zu definierten Zeitpunkten gewonnen und nach sofortigem Zentrifugieren das Plasma abgetrennt. Speichelproben wurden durch Simulation des Kauvorganges erhalten; Urin über 60 h p.appl. fraktioniert gesammelt (vgl. auch S. 126).

Die theoretischen Grundlagen zur Berechnung pharmakokinetischer Parameter sind auf S. 134 ff., die Meßwerte der analytischen Bestimmungen auf S. 146 dargestellt.

4.3.1. Pharmakokinetik des Isopropylaminophenazon (5) in Plasma, Speichel und Urin

Nach peroraler Einnahme von 5 erreichte der Plasmaspiegel des unveränderten Wirkstoffes nach 2 h (t_{max}) mit 16.5 µg/ml (c_{max}) sein Maximum. Bezogen auf 5 waren zu diesem Zeitpunkt ca. 5% der Dosis im Gesamtplasma vorhanden. Im Untersuchungszeitraum (bis 24 h p.appl.) konnte der Arzneistoff bei einer Nachweisgrenze von 1 µg/ml bis 12 h p.appl. in den Plasmaproben quantitativ bestimmt werden. Die Disposition von 5 aus dem Plasma verlief monoexponentiell (s. Abb. 30). Das pharmakokinetische Modell des Ein-Kompartiment-Systems[44] genügte zur Beschreibung der Daten. Durch Regressionsanalyse wurde die Eliminationsgeschwindigkeitskonstante $k_{el} = 0.4\ h^{-1}$ bestimmt. Die Eliminationshalbwertzeit von 5 ($t_{1/2el}$) betrug ca. 1.8 h.
Durch Momentanalyse wurde die mittlere Verweilzeit von 5 (MRT) mit 1.7 h berechnet. Die Fläche unter dem Konzentrationszeitprofil betrug 84 µg h/ml, die totale Clearance (Cl_t) 170 ml/min. Unter der Annahme einer weitestgehend vollständigen Absorption aus dem Gastrointestinaltrakt (wie sie für strukturähnliche Pyrazolinone beschrieben ist[28,31]) konnte das Verteilungsvolumen mit ca. 0.5 l/kg abgeschätzt werden.
Im Speichel ergab sich nach peroraler Einnahme einer wäßrigen Lösung eine Initialphase (bis 1 h p.appl.), die durch Mischung von Darreichungsform und Untersuchungsmaterial keine Aussagen über das pharmakokinetische Verhalten von 5 zuließ (s. Abb. 30). Aufgrund des Kurvenverlaufes kann angenommen werden, daß danach der Verlauf des Speichelspiegels den real absorbierten und vom Blut in den Speichel übergegangenen Wirkstoffanteil

darstellt. Die Elimination von 5 aus dem Speichel verlief annähernd parallel zu der aus dem Plasma ($t_{1/2el}$: ca. 2 h).

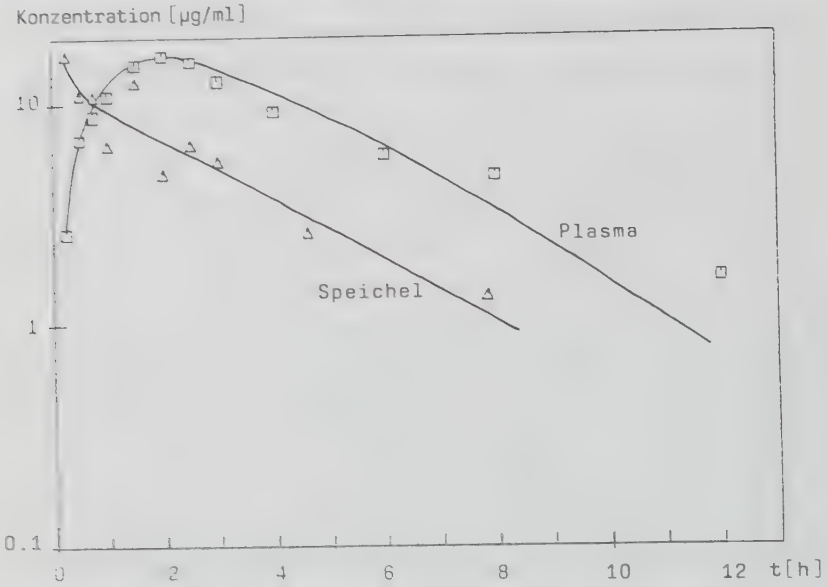


Abb. 30: Semilogarithmische Darstellung des Konzentrations-Zeit-Verlaufs von 5 in Plasma und Speichel nach p.o. Gabe von 1 g Isopropylaminophenazon-HCl (≙ 870 mg 5)

Im Urin konnte 5 nur im Verlauf von 12 h p.appl. nachgewiesen werden. Insgesamt wurden 1.8% der Dosis (≙ 15.7 mg 5) unmetabolisiert mit dem Harn ausgeschieden. Die renale Clearance (Cl_r) betrug 3.1 ml/min. Aus der Kenntnis von Cl_t und Cl_r konnte die nicht-renale Clearance (Cl_{nr}) mit ca. 167 ml/min und die hepatische Extraktionsquote mit ca. 20% berechnet werden.
Die pharmakokinetischen Parameter von 5 zeigen, daß der Wirkstoff relativ schnell aus dem Plasma eliminiert wird und eine Kumulation der unveränderten Verbindung bei normalem Dosierungs-

intervall (2 - 3 x tgl.) unwahrscheinlich ist. Die Eliminationshalbwertzeit beim Menschen ist mit der bei Ratten bestimmten[3] vergleichbar. Das abgeschätzte Verteilungsvolumen war etwas geringer als das Gesamtflüssigkeitsvolumen der Versuchsperson. Der hohe Wert der nicht-renalen im Vergleich zur totalen Clearance ist ein Hinweis auf eine extensive Metabolisierung von Isopropylaminophenazon (5), die im wesentlichen in der Leber ablaufen sollte.

Da vergleichbare Pyrazolinonstrukturen nur zu max. 15- 20% an Plasmaproteine gebunden vorliegen[28] und 5 derzeit nur als Kombinationspräparat mit dem extrem stark eiweißgebundenen Phenylbutazon[45] im Handel ist (so daß eher eine weitere Verdrängung von 5 aus der Bindung zu erwarten ist), wurde das Ausmaß der Plasmaeiweißbindung aufgrund der vermutlich geringen pharmakotherapeutischen Bedeutung nicht untersucht.

4.3.2. Pharmakokinetik ausgewählter Biotransformationsprodukte des Isopropylaminophenazon (5) in Plasma und Urin

Wie bereits beschrieben, sollten in diese Versuche nur Aminophenazon (6), Acetylaminophenazon (7) und Hydroxyphenazon (8) einbezogen werden (s. S.82 f.).

Bei Nachweisgrenzen von 1 - 3 µg/ml konnten alle drei Verbindungen in den Plasmaproben des Untersuchungszeitraumes (0.25 - 24 h p.appl.) nicht nachgewiesen werden.

Im Rahmen der Untersuchungen der Ausscheidung mit dem Urin konnte 6 nicht aufgefunden werden (vgl. hierzu auch S. 15).

Im Gegensatz dazu war Acetylaminophenazon (7) bis zu 55 h p.appl.

quantitativ nachweisbar. Insgesamt wurden 2.4% der Dosis als 7 im Urin ausgeschieden. Die Halbwertzeit der renalen Elimination (berechnet aus der semilogarithmischen Darstellung von $U_\infty - U(t)$ vs. t) betrug ca. 12 h (s. Abb. 31). Im Zusammenhang mit der langdauernden Ausscheidung von 7, das vermutlich die metabolische Vorstufe für die Bildung von N-2-Noracetylaminophenazon (12) ist, erscheint es erwähnenswert, daß Harnproben der Zeitpunkte 31 h bzw. 55 h p.appl. nach Hydrolyse eine Rotfärbung zeigten. Dies kann als Hinweis auf das Vorliegen von Farbstoffen (evtl. Rubazonsäurestrukturen) gewertet werden, bei deren Bildung 12 eine wichtige Rolle spielen könnte (vgl. S. 69 ff.).

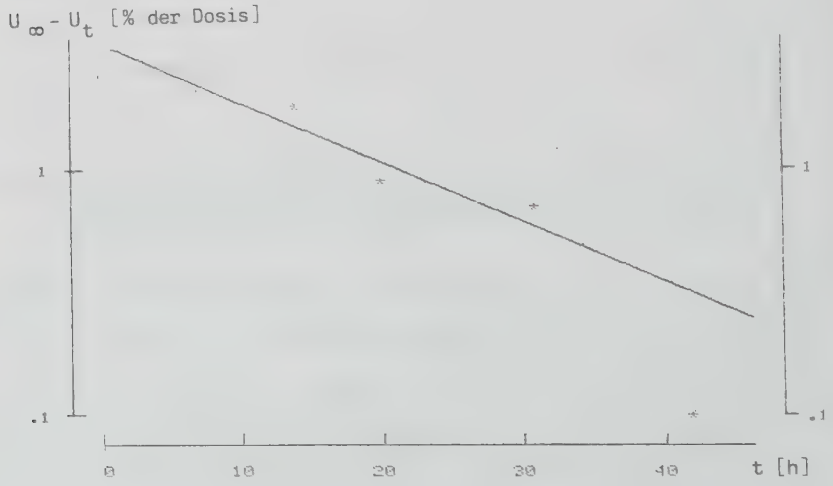


Abb. 31: Semilogarithmische Darstellung der renal zu eliminierenden Dosisanteile von Acetylaminophenazon (7) nach p.o. Gabe von 1 g Isopropylaminophenazon-HCl (≙ 870 mg 5)
(Sigma-Minus-Plot [59])

Hydroxyphenazon (8), das nur nach enzymatischer Hydrolyse des Harnes auftrat und somit vollständig in konjugierter Form (Sulfat- und/oder Glucuronid -vgl. S. 56 f.-) ausgeschieden wurde, konnte nur bis 12 h p.appl. nachgewiesen werden. In diesem Zeitraum wurden 10.5% der Dosis als 8 renal eliminiert. In den Proben späterer Versuchszeiträume trat ein verbreiterter Peak mit geringfügig (0.1 min) längerer Retentionszeit auf. Aufgrund der Peakform und des ausschließlichen Auffindens von 8 im 12 h-Sammelharn beim DC-Screening (s. S. 15 ff.) wurde der genannte Peak nicht als 8 quantitativ ausgewertet. Vermutlich tritt entweder zusätzlich oder ausschließlich ein weiterer Metabolit von 5 mit ähnlichem chromatographischen Verhalten hier auf.

Die Untersuchungen zur renalen Ausscheidung einiger Biotransformationsprodukte von 5 haben gezeigt, daß der Wirkstoff selbst nur in sehr geringem Anteil und relativ schnell nach Verabreichung im Urin auftritt. Dies kann als zusätzlicher Anhaltspunkt für die extensive Metabolisierung von 5 gewertet werden. Auch mittels HPLC-Analyse konnte bestätigt werden, daß Aminophenazon (6) z.T. nicht nachweisbar war (vgl. S. 15). Hydroxyphenazon (8) stellt einen neuen, quantitativ bzgl. der Urinausscheidungsbilanz bedeutsamen Metaboliten von 5 dar. Zusammenfassend bleibt festzustellen, daß offensichtlich die in Abb. 24 (S.57) dargestellten weiteren Biotransformationsprodukte des Isopropylaminophenazon (5), besonders die N-2-Norverbindungen, einen entscheidenden Anteil der Metaboliten darstellen. Die bioanalytische Bestimmung dieser Verbindungen ist allerdings ohne erheblichen präparativen und analytischen Aufwand unmöglich.

4.4. Vergleich pharmakokinetischer Parameter von Isopropylaminophenazon (5), Dimethylaminophenazon (3), Noramidopyrinmethansulfonat-Natrium (4) und Phenazon (1)

Im folgenden sollen die Ergebnisse zum pharmakokinetischen Verhalten von 5 im Vergleich zu bekannten Literaturdaten anderer Pyrazolinonderivate bewertet werden. Für Noramidopyrinmethansulfonat-Na (4) werden die kinetischen Parameter von Monomethylaminophenazon (9) herangezogen, da diese Substanz bereits bei hydrolytischer Spaltung von 4 im Gastrointestinaltrakt entsteht und unverändertes 4 im Plasma nicht nachweisbar ist[28]. (Ausgewählte pharmakokinetische Daten von 1, 3, 5 und 9 sind in Tab. 7, S. 95 zusammengefaßt.)

Die enterale Absorption von 5 ist mit denen von 3 und 9 vergleichbar; maximale Wirkstoffspiegel werden nach ca. 1 - 2 h p.appl. erreicht. Auch die Konzentrationen des jeweiligen Wirkstoffes sind nach gleicher peroraler Dosierung ähnlich. Die Geschwindigkeitskonstanten der Elimination aus dem Plasma bzw. die korrespondierenden Dispositionshalbwertzeiten liegen für alle 3 Verbindungen bei 2 - 3 h. Die Verteilungsvolumina von 3 und 5 entsprechen annähernd dem Gesamtkörperwasser. Die strukturelle Ähnlichkeit der drei Aminopyrazolinone scheint maßgeblichen Einfluß auf das pharmakokinetische Verhalten zu haben. Demgegenüber steht das nicht C-4-aminosubstituierte Phenazon (1), das sich hinsichtlich der Plasmaeliminationshalbwertzeit mit $t_{1/2el}$ = 12 h um den Faktor 4 - 5 von den o.g. Verbindungen unterscheidet. Bei diesem Pyrazolinon ist die Varianz der pharmakokinetischen Kenndaten wesentlich größer, da interindividuelle genetisch

determinierte Unterschiede in der Metabolisierung von entscheidender Bedeutung[50] sind.

Verbindung:	1	3	4 bzw. 9*	5
Literatur:	34, 49)	46, 27, 51)	47, 48)	-
Dosis (p.o.):	600 mg	400 - 500 mg	1000 mg	870 mg
c_{max} [µg/ml]	-	~10	7.8 ± 2.1	16.5
t_{max} [h]	-	1.5	1.8 - 2.5	2
$t_{1/2el}$ [h]	12.8**	2.9	2.4	1.8
V_d [l/kg]	-	0.6	-	0.5
Urinausscheidung [% der Dosis]				
Wirkstoff	3	≤10	0 (4) ~5 (9)	1.8
7	-	24 - 48	~30	2.4
8	38	0.3	-	≥10.5

c_{max}: maximaler Plasmaspiegel t_{max}: Zeitpunkt von c_{max}

$t_{1/2el}$: Eliminationshalbwertzeit V_d: Verteilungsvolumen

*: vgl. Text S. 94 **: pharmakogenetische Unterschiede, vgl. Text S. 94

Tab. 7: Gegenüberstellung pharmakokinetischer Parameter von Pyrazolinonen

Mit Blick auf die Biotransformation von 3 und 4 wird der überwiegende Anteil der Metaboliten primär durch die Desalkylierung der C-4-Aminogruppe gefolgt von Acetylierung bzw. Formylierung gebildet. Oxidative metabolische Reaktionen (Bildung von 8) konnten bislang nur bei 3 in untergeordnetem Ausmaß gefunden werden.

Im Gegensatz dazu verläuft die Verstoffwechslung von 1 im wesentlichen unter Bildung oxidierter Produkte (vgl. S. 7).

Auffällig ist beim Isopropylaminophenazon (5), daß

1) die Desalkylierung der C-4-Aminogruppe offensichtlich nur von untergeordneter Bedeutung ist und
2) im Vergleich zu 3 und 4 ein relativ hoher Dosisanteil als Hydroxyphenazon (8) im Urin ausgeschieden wird.

Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, daß der enzymatische Abbau der Isopropylgruppe im Gegensatz zur Demethylierung erschwert ist. In-vitro-Untersuchungen an Lebermikrosomen mit mono- und disubstituierten Homologen von 3 belegen, daß die pro Zeiteinheit gebildete Menge an Aminophenazon (6) mit zunehmender Kettenlänge der Substituenten abnimmt[52]. Da aber auch unveränderter Wirkstoff nur in geringem Ausmaß renal eliminiert wird, könnte beim Isopropylaminophenazon (5) die N-2-Demethylierung neben der Bildung von 8 von großer Bedeutung sein. Unter dem Vorbehalt, daß sich die o.g. in-vitro-Daten in vivo übertragen lassen, könnte die Quantifizierung des N-2-Norisopropylaminophenazon (19) die Ausscheidungsbilanz möglicherweise wesentlich verbessern.

5. UNTERSUCHUNGEN ZUM ENTZÜNDUNGSPHARMAKOLOGISCHEN EFFEKT VON ISOPROPYLAMINOPHENAZON (5)

5.1. Hemmung der Bildung von Prostaglandinen

Im Stoffwechsel der Arachidonsäure werden im Rahmen des Cyclooxygenaseweges (vgl. S. 12) Prostaglandine, Prostacyclin sowie Thromboxane gebildet. Diese Gewebshormone sollen mit unterschiedlicher Potenz an den verschiedenen Manifestationen des Entzündungsgeschehens beteilgt sein. PGD_2, PGE_1, PGE_2, PGG_2 und PGI_2 verstärken die vaskulären Reaktionen, die die Frühphase einer akuten Entzündung bestimmen. Eine Hemmung der Cyclooxygenase und damit der Entstehung der vasodilatierenden Arachidonsäuremetaboliten ist ein gemeinsames Merkmal nicht steroidaler Antiphlogistika[60] (z.B. Acetylsalicylsäure, Anthranilsäure- und Arylcarbonsäurederivate).

In vitro kann die Inhibition der Prostaglandinsynthese an Präparationen unterschiedlicher tierischer Gewebe getestet werden. Da für Isopropylaminophenazon (5) diesbezüglich keine Befunde vorlagen, sollte der Arzneistoff in Hinblick auf seine Hemmaktivität charakterisiert werden.

Es ist bekannt, daß Substanzen mit planarer vicinaler Hydroxy-oxo-Partialstruktur die Prostaglandinbildung in vitro hemmen[61]. Bei den Untersuchungen der Biotransformation von 5 konnte mit Hydroxyphenazon (8) ein Metabolit gefunden werden, der dieses spezifische Strukturelement enthält. Insofern erschien es vielversprechend, 8 in die Studie einzubeziehen.

Als weiteres Pyrazolinonderivat wurde Phenazon (1), das keinen elektronenreichen Substituenten in der C-4-Position aufweist, vergleichend untersucht.

Die Versuche wurden an Präparationen des Rattennierenmarks durchgeführt (s. S. 137). Zur Bestimmung der Hemmung der Prostaglandinsynthese wurde zunächst die Bildung von Prostaglandinen im maximal aktivierten In-vitro-System untersucht. Die Präparation wurde unter Zusatz von Adrenalin (Enzymaktivator) mit einer definierten Menge 1-^{14}C - Arachidonsäure inkubiert und die gebildete Menge an Prostaglandinen (nach Abtrennung nicht umgesetzter Arachidonsäure) durch szintillationsspektrometrische Messung bestimmt (≙ 100% Ausbeute). Ein 10^{-5} M Zusatz von Indometacin ließ in diesem System die Ausbeute an Prostaglandinen auf 0-1% sinken.

Isopropylaminophenazon (5) und Hydroxyphenazon (8) führten zu einer Hemmung der Bildung von Prostaglandinen in der beschriebenen Versuchsanordnung. Vollständige Enzyminhibition zeigten beide Stoffe jedoch erst bei Konzentrationen von 10^{-3} M. Im Konzentrationsbereich von 10^{-4} M sinkt ihre Hemmaktivität bereits auf 10% ab. Phenazon (1) beeinflußte selbst bei Konzentrationen von 10^{-3} M das Enzymsystem nicht. Vergleicht man diese Resultate mit denen des Indometacin, so dürfen 5 und 8 nur als schwache Hemmstoffe der Cyclooxygenase angesehen werden.

5.2. Entzündungshemmung von Isopropylaminophenazon (5) und Hydroxyphenazon (8) am Modell des provozierten Rattenpfotenödems

Isopropylaminophenazon (5) und sein Metabolit 8 zeigten in vitro (s. S. 98) vergleichbare inhibitorische Effekte bzgl. der Cyclooxygenaseaktivität. Die antiphlogistische Potenz beider Substanzen sollte in vivo am Modell der Beeinflussung der Carrageenin-induzierten Rattenpfotenödems (vgl. S. 137f.) vergleichend untersucht werden.

Beide Verbindungen wurden im Dosisbereich 100-1000 mg 8 / kg bzw. 30-300 mg 5 / kg peroral 1 h vor Ödemprovokation appliziert. Auf die Dosis bezogen zeigte 8 (ca.-ED_{25} = 650 mg / kg p.o.) eine etwa 14-fach schwächere Wirkung auf das Abschwellen der entzündeten Rattenpfote als 5 (ca.-ED_{25} = 45 mg / kg p.o.) (vgl. Tab. 8).

Bei der Bewertung dieses Befundes sollte berücksichtigt werden, daß beide Substanzen ausschließlich peroral verabreicht wurden, jedoch

1) Studien zur Bioverfügbarkeit von Hydroxyphenazon (8) fehlen und
2) die Verstoffwechselung von 8, z.B. durch Konjugation mit Glucuronsäure bzw. Sulfat, zu einer schnellen Eliminierung der Verbindung führen könnte.

Substanz	Dosis p.o. [mg/kg]	n	maximale Ödemhemmung während 7 h p.appl. [%]	$p^{+)}$	ca.-ED_{25} [mg/kg]	ca.-ED_{50} [mg/kg]
Hydroxy-	100	10	6	n.s.		
phenazon (8)	300	10	14	*	650	
	1000	10	32	***		
Isopropylamino-	30	10	14	n.s.	45	150
phenazon (5)	100	20	45	***		
	300	10	56	***		

+): Student-Welch-Test; n.s.-nicht signifikant; * - $p < 0.05$, *** - $p < 0.001$ einseitig bestimmt

Tab. 8: Einfluß von 5 und 8 nach p.o. Verabreichung auf das Carrageeninödem der Rattenhinterpfote

(Versuchsdurchführung und -auswertung: s. S.137f.)

5.3. Reaktion von Singulett-Sauerstoff mit Isopropylaminophenazon (5)

Sauerstoff spielt an zwei Stellen der Prostaglandinsynthese eine entscheidende Rolle.

1) Bei der Synthese von PGG_2 werden 2 Mol Sauerstoff benötigt.

2) Der Zerfall von PGG_2 zu PGH_2 liefert Sauerstoff.

In beiden Fällen wird nicht Triplett-Sauerstoff die aktive Spezies sein, sondern ein reaktiverer Sauerstoff, wobei der Aktivierungsmechanismus z.T. ungeklärt ist. Neben einem radikalischen Mechanismus wird bei der Biosynthese von PGG_2 auch die Beteiligung von $^1O_2$ (Singulett-Sauerstoff) diskutiert[16]. Sollte dieser am physiologischen Mechanismus beteiligt sein, wäre eine pharmakotherapeutische Beeinflussung dieser Reaktion möglich, wenn Arzneistoffe, die in die Prostaglandinsynthese eingreifen, auch gleichzeitig chemisch in der Lage sind, mit $^1O_2$ zu reagieren.

Eine zweite Möglichkeit zum Eingriff in die Prostaglandinsynthese besteht in einer Abfangreaktion von freigesetztem $^1O_2$ nach Zerfall von PGG_2 zu PGH_2[19]. Durch die vermehrte Bildung von PGH_2 und die daraus resultierende Abnahme von PGG_2 wäre eine Entzündungshemmung sogar bei Stimulation des Cyclooxygenaseweges denkbar, da PGG_2 die größere inflammatorische Potenz als PGH_2 besitzt.

Daher sollte die Reaktivität des antiphlogistisch wirkenden Pharmakon 5 mit $^1O_2$ geprüft werden. Vergleichbare Untersuchungen zum Indometacin sind bereits beschrieben[20].

In einer geeigneten Apparatur (s. S. 124), die den Arzneistoff und den Sensibilisator Methylenblau in einer Pufferlösung (pH 7,4) enthielt, wurde mittels Sauerstoffdurchfluß und Bestrahlung im VIS-Bereich $^1O_2$ erzeugt. Der Verlauf der Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch ausgewertet. Nach 3 h hatte sich das Pharmakon 5 zu einem einheitlichen Reaktionsprodukt 28 umgesetzt. Nach entsprechender Aufarbeitung (s. S.138f.) wurde 28 sowohl massenspektrometrisch als auch NMR-spektroskopisch analysiert.

a) MS-Untersuchungen

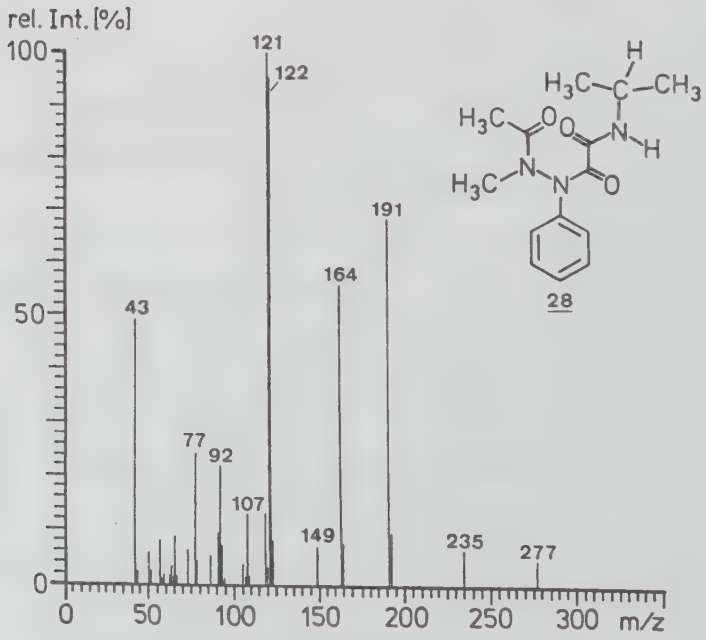


Abb. 32: EI-MS-Spektrum von 28 (120° C, 80 eV)

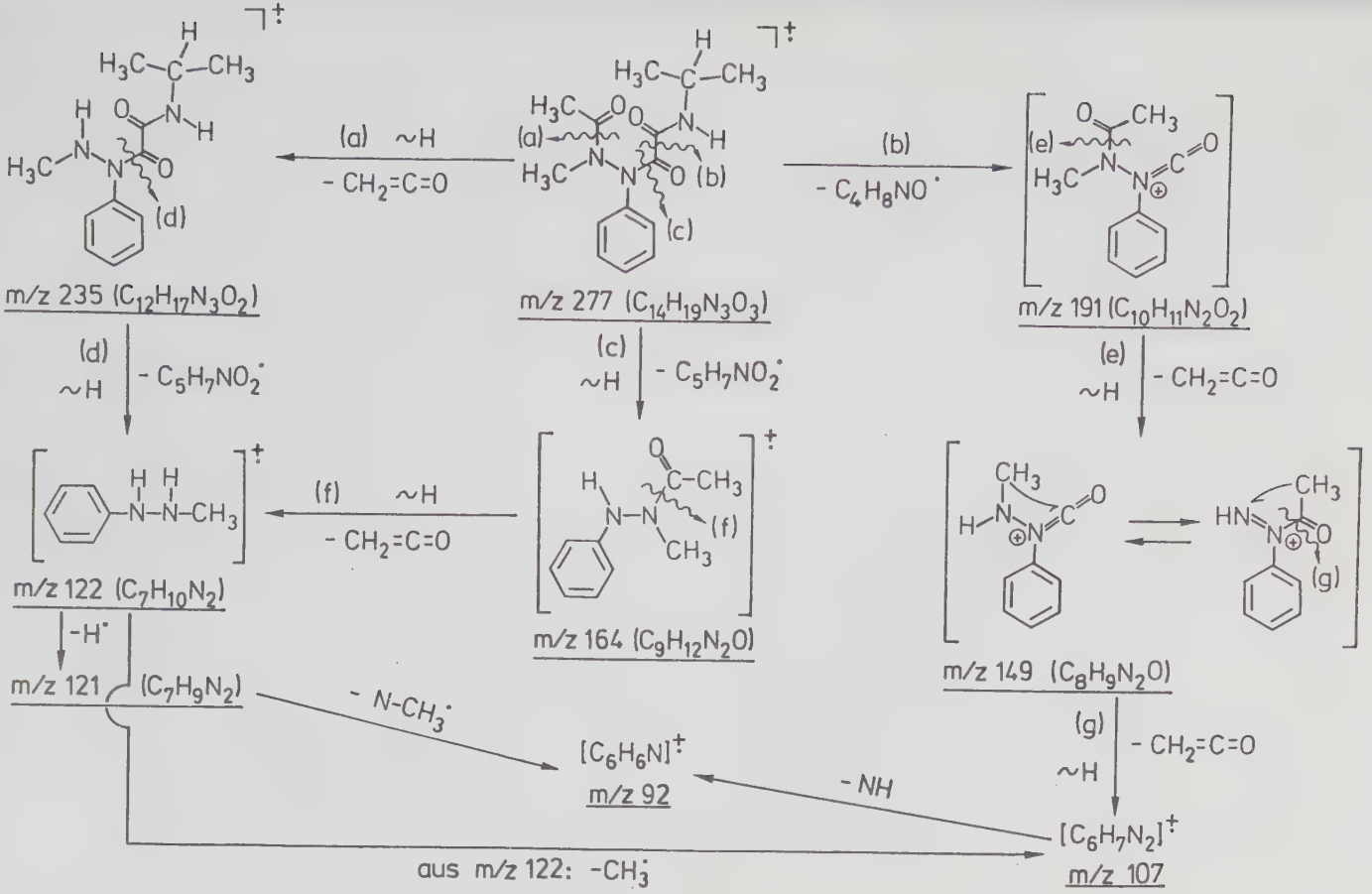


Abb. 33: Strukturspezifische Fragmentierungen von 28

Die Hochauflösungsdaten des Molekülradikalions m/z 277 ($C_{14}H_{19}N_3O_3$) zeigen, daß 28 im Vergleich zu Isopropylaminophenazon (5) zusätzlich zwei Sauerstoffatome enthält. Die initiale, für acetylierte Verbindungen charakteristische Keten-Abspaltung zu m/z 235 (a) (vgl. Abb.33) läßt sich durch ein Oxidationsprodukt von 5 unter Beibehaltung der Pyrazolinonstruktur nicht erklären. Die Folgefragmentierungen, besonders das Auftreten weiterer Keteneliminierungen, belegen ein typisches durch [2+2]-Cycloaddition mit anschließender Ringöffnung gebildetes Singulett-Sauerstoff-Produkt (vgl. S.103). Die strukturspezifischen Zerfälle von 2,5,6-Triketo-3,8-dimethyl-4-phenyl-3,4,7-triazanonan (28) sind in Abb.33 dargestellt und sollen an dieser Stelle nicht näher diskutiert werden.

b) NMR-Untersuchungen

Das ^{1}H-NMR-Spektrum des Singulett-Sauerstoff-Reaktionsproduktes 28 in $CDCl_3$ weist grundsätzlich die gleiche Anzahl Protonensignale auf wie ein unter gleichen Bedingungen aufgenommenes Spektrum des Isopropylaminophenazon (5) (s. Abb. 34). Die Integrale (auf deren Darstellung aus Gründen der Übersichtlichkeit bewußt verzichtet wurde) zeigten, daß die Summe der Protonen bei 28 im Vergleich zu 5 ebenfalls unverändert ist. Die Signale im Spektrum von 28 sind jedoch stark verbreitert. Zur Klärung der Frage, ob zeitabhängige Phänomene für die Linienverbreiterung verantwortlich sind, wurde

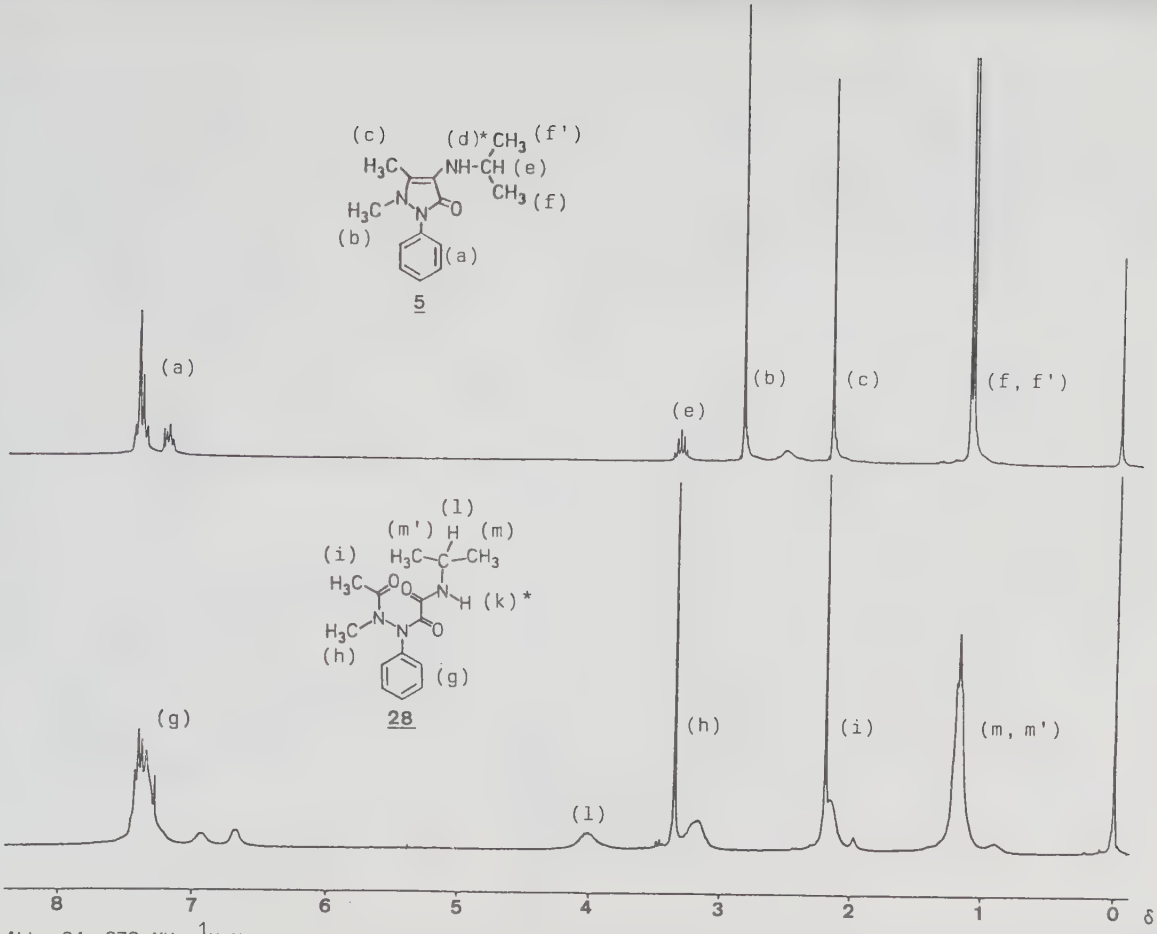
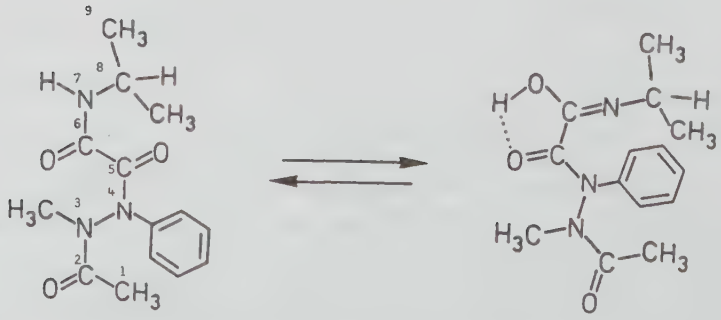


Abb. 34: 270-MHz-^{1}H-NMR-Spektren von 5 und 28 in $CDCl_3$ (interner Standard TMS)(* NH - nicht zu erkennen)

von 28 ein Tieftemperaturspektrum bei -30° C aufgenommen. Da die aromatischen Protonen bei dieser Messung keine wesentliche Veränderung erfuhren, ist in Abb. 35 nur der Bereich von 0-5 ppm dargestellt. Auffällig ist, daß die zuvor verbreiterten Signale der C-Methyl-, N-Methyl- sowie der Methylgruppen des Isopropylsubstituenten in jeweils vier Signale charakteristischer Intensitätsverteilung aufgespalten werden. Es sollten also bei tiefer Temperatur vier Tautomere oder Rotationsisomere von 28 vorliegen. Um auszuschließen, daß es sich dabei um Tautomere handelt, wurde die Lösungsmittelabhängigkeit des Isomerengemisches im polaren protischen Solvens CD_3OD (in Gegensatz zu $CDCl_3$) untersucht. Die Abb. 36 zeigt, daß die Intensitätsverteilungen der aufgespaltenen Protonenresonanzen weitestgehend lösungsmittelunabhängig sind.



2,5,6-Triketo-3,8-dimethyl-4-phenyl-3,4,7-triazanonan (28)

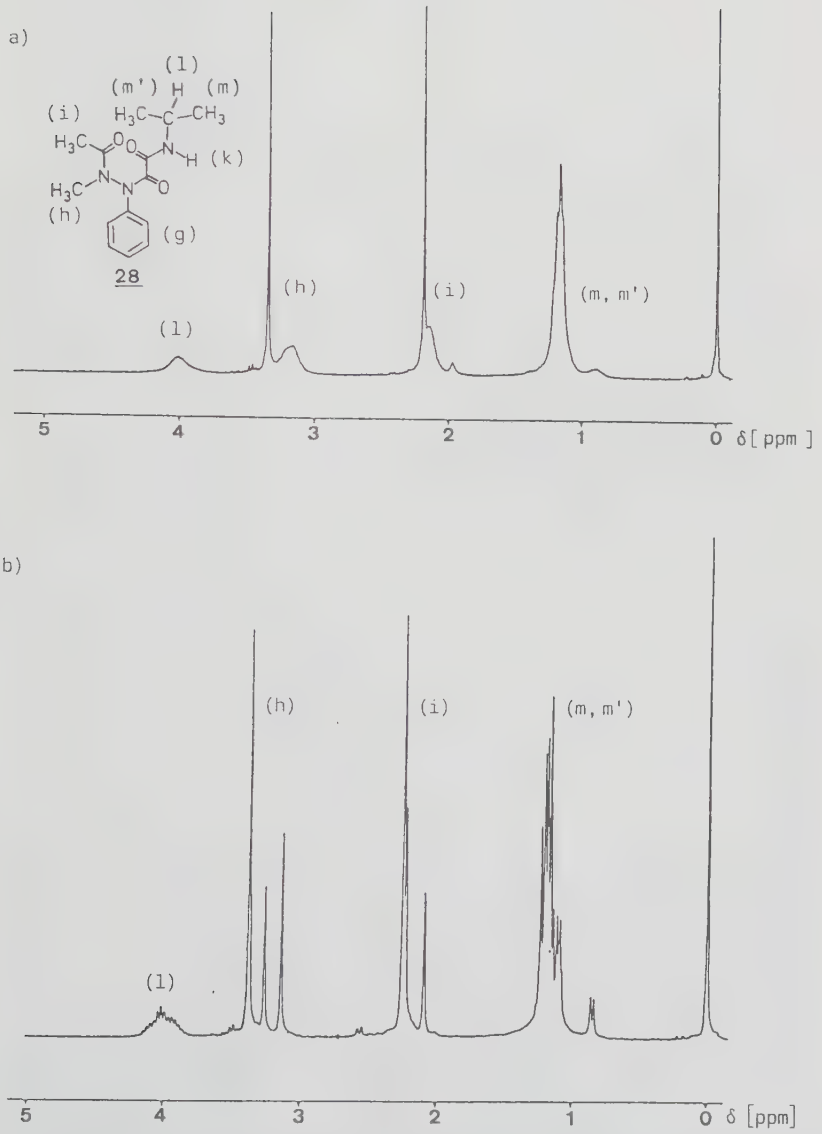
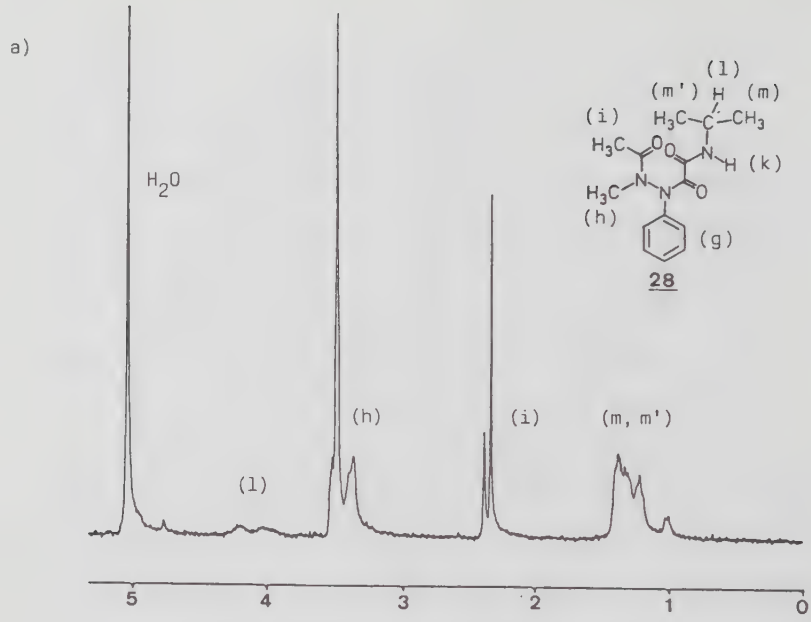


Abb. 35: 270-MHz-^{1}H-NMR-Spektren von 28 in $CDCl_3$ (interner Standard TMS)
a) Normalbedingungen b) bei - 30° C



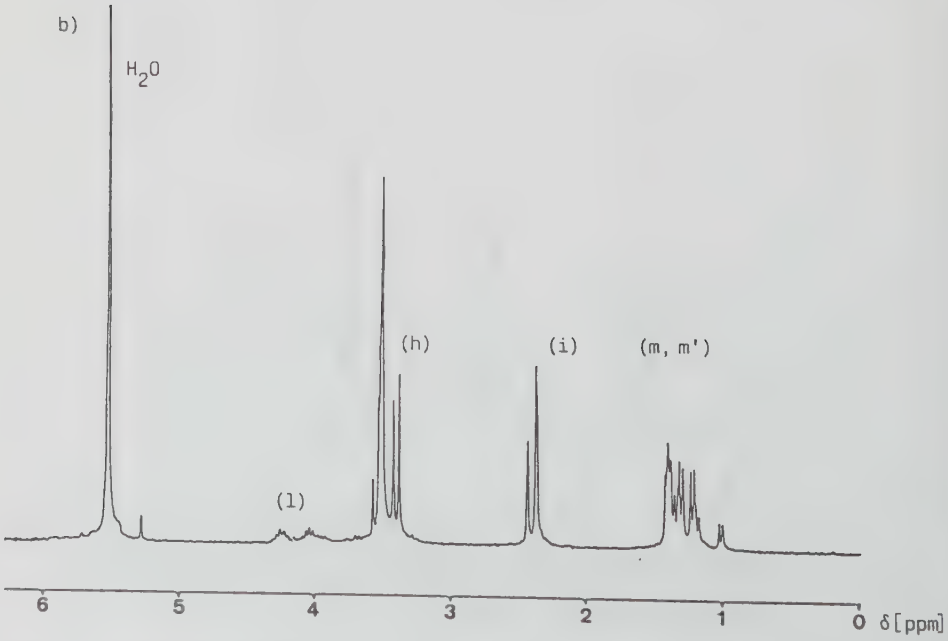
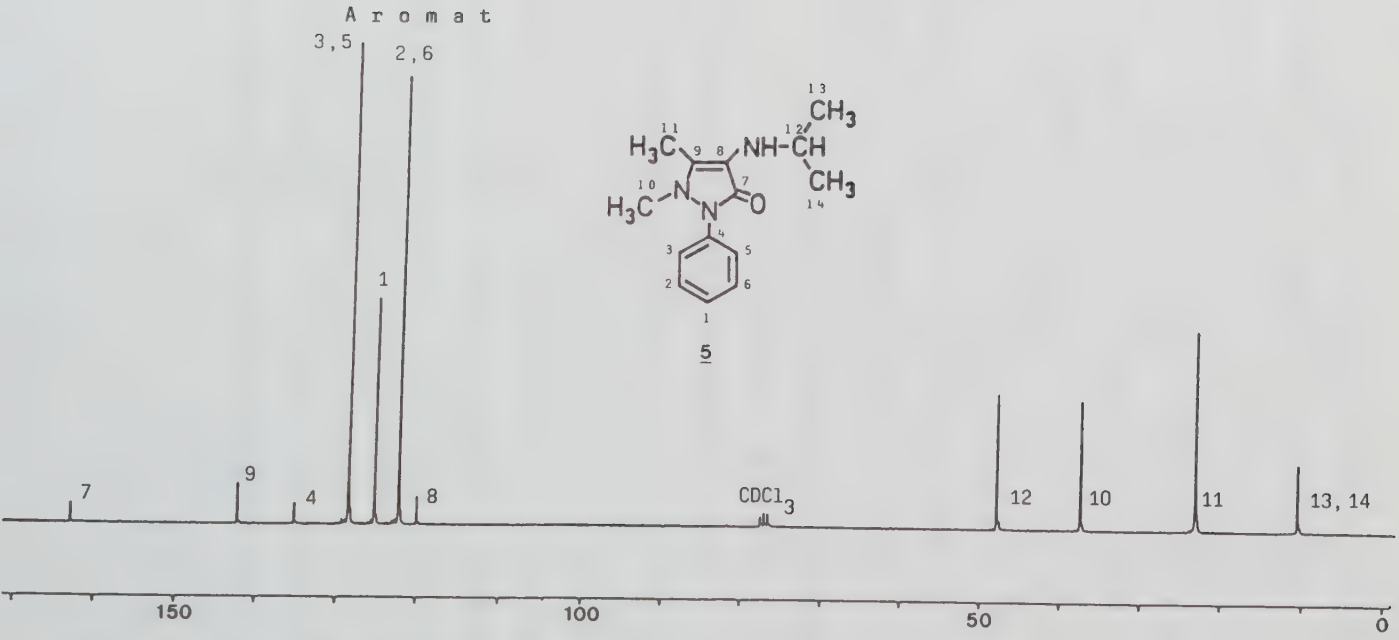


Abb. 36: 270-MHz-^{1}H-NMR-Spektren von 28 in CD_3OD

a) Normalbedingungen b) bei - 30° C

Zur Prüfung des ausschließlichen Vorliegens von vier Rotationsisomeren wurden ^{13}C-NMR-Messungen durchgeführt (s.S.110 f.). Prinzipiell sollte bei der ^{13}C-NMR-Analyse unter Protonen-Rauschentkopplung jedes C-Atom als Singulett auftreten (vgl. Abb.37). Das Produkt 28 zeigt jedoch eine Aufspaltung jedes C-Signals im Verhältnis 5 : 1 : 2 : 2,5 . Hieraus kann eindeutig auf das Vorliegen von vier Rotameren geschlossen werden. Das Molekül enthält drei Amidbindungen mit partiellem Doppelbindungscharakter. Aufgrund des Vorliegens von vier Rotameren sollten aber nur zwei dieser Bindungen an diesem Phänomen beteiligt sein. Um welche Bindungen es sich hierbei handelt, ist jedoch bislang nicht eindeutig zuzuordnen und Gegenstand weiterer detaillierter Untersuchungen[53].

Für die Strukturaufklärung ist weiterhin von Bedeutung, daß in den ^{1}H-NMR-Tieftemperaturspektren (s. Abb. 35 und 36) die Methylprotonen der Isopropylgruppe eindeutig mehr als vier Dubletts (zweifelsfrei erkennbar: sieben Dubletts) aufweisen. Dies belegt, daß beide Methylgruppen des Isopropylsubstituenten chemisch nicht äquivalent, sondern diastereotop sind. Das Molekül muß folglich chiral sein. Die für 28 gesicherte Struktur besitzt jedoch kein asymmetrisches C-Atom, sodaß das Chiralitätszentrum an einem Stickstoffatom lokalisiert sein muß. Aufgrund der sterischen Hinderung der Inversion des freien Elektronenpaares des Stickstoffs im Falle der Phenylsubstitution ist dieses N-Atom als Asymmetriezentrum anzunehmen.



5

Abb. 37: 270-MHz-^{13}C-NMR-Spektrum von 5 in $CDCl_3$

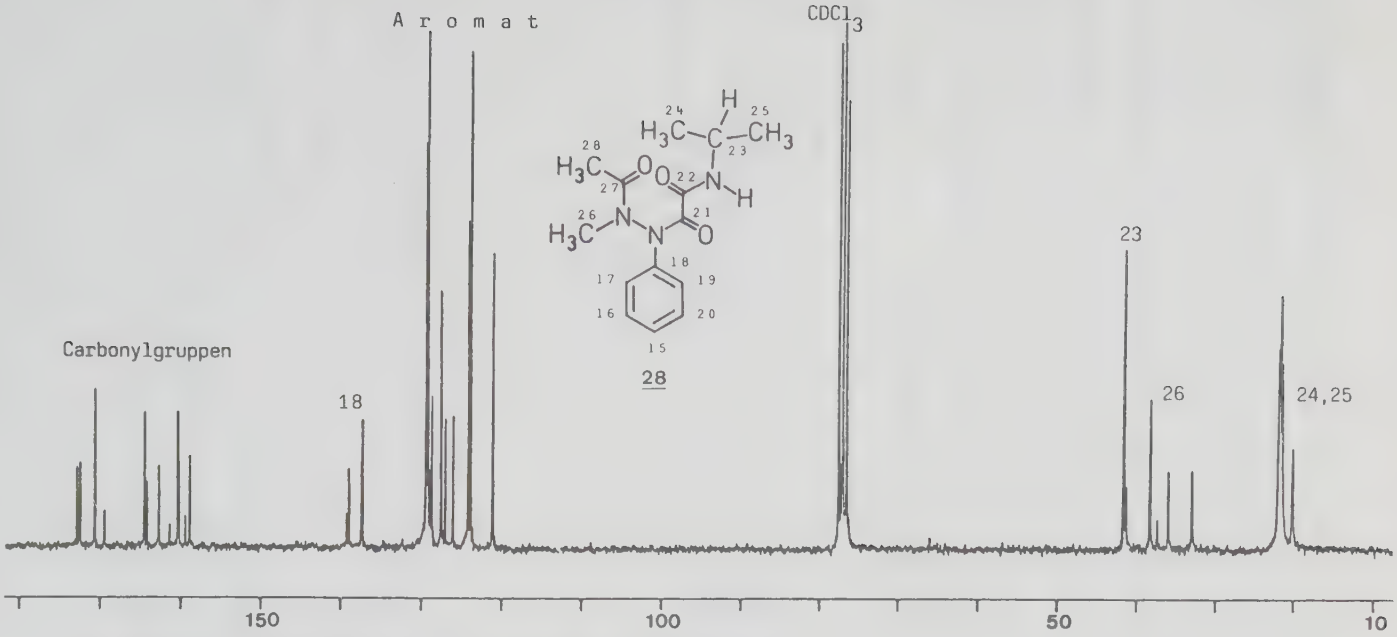
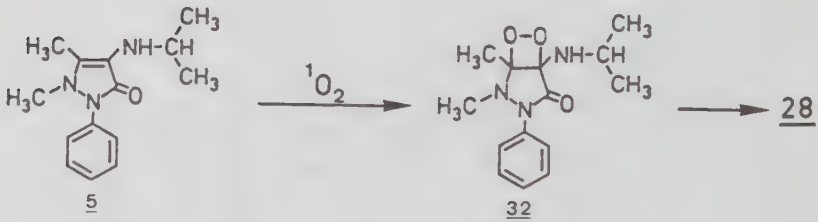


Abb. 38: 270-MHz-^{13}C-NMR-Spektrum von **28** in $CDCl_3$ (-30° C)

Die nach MS- und NMR-Untersuchungen gesicherte Struktur von 28 (2,5,6-Triketo-3,8-dimethyl-4-phenyl-3,4,7-triazanonan) repräsentiert ein typisches Singulett-Sauerstoff-Reaktionsprodukt. Im Rahmen einer [2+2]-Cycloaddition an die C3-C4-Doppelbindung des Isopropylaminophenazon (5) (elektrophile Addition an die aktivierte Doppelbindung) tritt als Folgereaktion der Bildung eines Dioxetan-Zwischenproduktes (32) eine Öffnung des Pyrazolidinringes ein. Diese neue Verbindung (28) weist in der ursprünglichen C3-bzw. C4-Position jeweils eine Keto-Funktion auf.



5 32

Aufgrund der chemischen Eigenschaft von Radikal-Sauerstoff wäre dieser im Gegensatz zu Singulett-Sauerstoff nicht in der Lage,ein derartiges Reaktionsprodukt zu bilden. Erwartungsgemäß konnte gezeigt werden, daß nach Zusatz des selektiven $^1O_2$-Quenchers DABCO®(1,4-Diazabicyclo[2,2,2]octan) die Umsetzung unter ansonsten gleichen Bedingungen nur mit äußerst geringer Ausbeute ablief.

Die relativ schnelle und quantitative Reaktion von $^1O_2$ mit 5 zu 28 läßt eine Beeinflussung der Prostaglandinsynthese über einen Singulett-Sauerstoff-Abfangmechanismus grundsätzlich möglich erscheinen. Weitere Hinweise für einen solchen Mechanismus könnten erbracht werden, wenn 28 nach Inkubation von 5 mit einer Prostaglandinsynthasepräparation (vgl. S. 97) nachweisbar wäre.

Im Rahmen der fraktionierten Verdampfung (s. S. 50) konnte eine Verbindung gefunden werden, die, verglichen mit 28, identische Masse und elementare Zusammensetzung aufwies. Da eine genaue Strukturaufklärung aufgrund der äußerst geringen Menge dieser Verbindung über einen MS/MS-Abbau nicht möglich war, sollte durch alternative analytische Verfahren untersucht werden, ob es sich bei dieser Substanz möglicherweise um 28 handelte.

Mit Hilfe eines für den Nachweis von 28 geeigneten HPLC-Verfahrens (s. S. 124, Fließmittelsystem D) wurde ein XAD-Extrakt (s. S. 129) eines 0 - 12 h - Harnes (nach Einnahme von 1 g 5) analysiert (Direkteinspritzung: 20 µl).
Das Singulett-Sauerstoff-Produkt 28 konnte unter diesen Bedingungen nicht nachgewiesen werden (vgl. Abb. 39, S. 114).

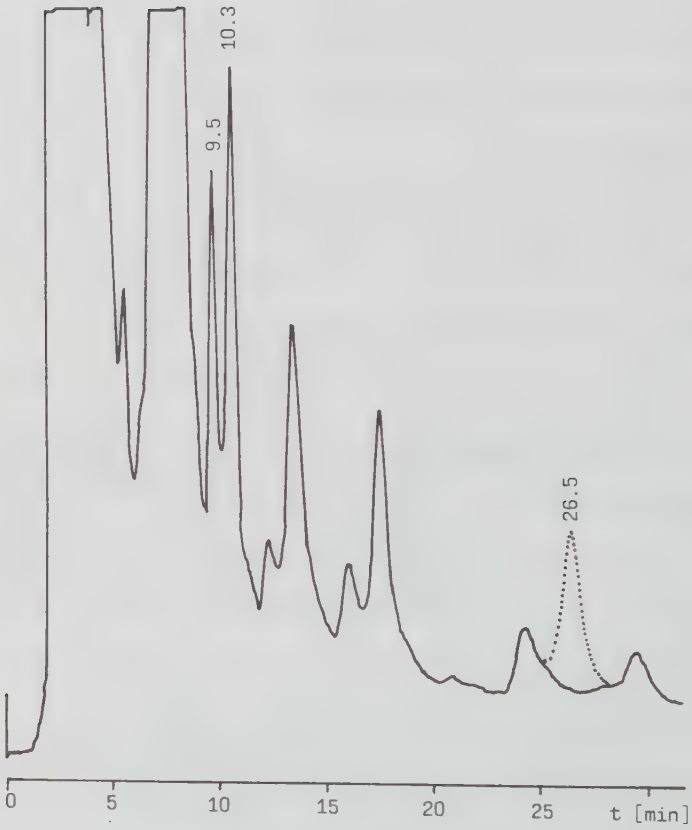


Abb. 39: HPLC-Chromatogramm eines XAD-Harnextraktes (0-12 h p.appl. von 5)

——— Harnextrakt

····· Zusatz von 28

(HPLC-Bedingungen: s. S. 124 , Fließmittelsystem D)

V. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur Analytik, Biotransformation, Entzündungspharmakologie und Pharmakokinetik des Isopropylaminophenazon (5) unter Berücksichtigung anderer Pyrazolinonderivate beschrieben.
Aufgrund des unzureichenden Kenntnisstandes bzgl. der Metabolisierung von 5 beim Menschen war diese Fragestellung von besonderer Bedeutung.
Unter Anwendung der präparativen Dünnschichtchromatographie, der ^{1}H-NMR- und MS-Analyse konnten nach Einnahme von 5 aus Humanharnproben, neben den tierexperimentell bereits beschriebenen Abbauprodukten Aminophenazon (6) und Acetylaminophenazon (7), HYDROXYPHENAZON (8) und HYDROXYISOPROPYLAMINOPHENAZON (18) als neue Metaboliten isoliert und identifiziert werden.
Das massenspektrometrische Fragmentierungsverhalten ausgewählter Pyrazolinone wurde anhand von isolierten Metaboliten und vorliegenden Referenzsubstanzen unter den Bedingungen der elektronenstoßinduzierten- und chemischen Ionisation sowie der MS/MS-Technik (im vorliegenden Fall: Zerfall des jeweiligen Molekülions im 2. feldfreien Bereich) untersucht.
Diese Kenntnisse und die Kombination der o.g. MS-Verfahren bei fraktionierter Verdampfung entsprechend angereicherter Extrakte aus biologischem Material ermöglichten die Separierung und Identifizierung von Phase-I-Biotransformationsprodukten (ggf. als Aglyca entsprechender Phase-II-Verbindungen) ohne vorherige Anwendung herkömmlicher Trennverfahren.

Durch diese Gemischanalyse konnten neben den Metabolisierungsprodukten 6, 7, 8 und 18 mit DIHYDROXYPHENAZON (14), NORISOPROPYLAMINOPHENAZON (19) und NORACETYLAMINOPHENAZON (12) drei weitere Phase-I-Strukturen von Metaboliten von 5 identifiziert werden.
Die Anwendbarkeit der erarbeiteten MS-Verfahrenskombination wurde am Beispiel von Dimethylaminophenazon (3), Noramidopyrinmethansulfonat-Na (4) und Phenazon (1) geprüft. Aus Metabolitengemischen konnten die wesentlichen literaturbekannten Abbauprodukte bestätigt werden; für 3 und 4 wurden zusätzlich eindeutige Hinweise auf das Vorliegen von NORFORMYLAMINOPHENAZON (25) und NORACETYLAMINOPHENAZON (12) als renale Exkretionsformen erhalten.
Ein besonderer Vorteil des beschriebenen Screening-Verfahrens besteht in der Möglichkeit des Nachweises von Metaboliten (Phase II Strukturen als korrespondierende Phase-I-Verbindungen) ohne vorherige Hydrolyse, die besonders im Fall der Aminopyrazolinone zu Folgereaktionen führen kann.
Zur Identifizierung intakter Konjugate wurde die FAB-Massenspektrometrie aus Gemischen eingesetzt. Als Stoffwechselprodukte von 5 konnten das Sulfat und das Glucuronid von Hydroxyphenazon (8) und die Glucuronide von 12 und 19 nachgewiesen werden.
Der kombinierte Einsatz der aufgeführten MS-Verfahren stellt eine neue Methode des Metabolitenscreening dar, wobei die Identifizierung von Biotransformationsprodukten ohne aufwendige Probenvorbereitung direkt aus Gemischen erfolgt.
Weiterhin konnte gezeigt werden, daß das Auftreten von Rubazon (26) und Methylrubazonsäure (27) im Harn nach Einnahme

der Aminopyrazolinone 3, 4 und 5 auf die artefizielle Bildung dieser Strukturen zurückzuführen ist. Als metabolische Vorstufen wurden 12 und 25 diskutiert.

Für Isopropylaminophenazon (5) wurde ein GC-Verfahren (N-FID) und ein HPLC-Verfahren (UV-Detektion) beschrieben. Bei geringfügiger Variation der analytischen Bedingungen konnten auch einige Biotransformationsprodukte von 5 bioanalytisch bestimmt werden. Optimale Extraktionsausbeuten aus biologischen Proben wurden für 5 bei Elution über Extrelut®-Fertigsäulen bei pH > 7 unter Verwendung von Chloroform (Wiederfindung > 90%) erzielt.

Die orientierenden pharmakokinetischen Untersuchungen haben gezeigt, daß 5 mit einer Plasmaeliminationshalbwertzeit von ca. 2 h und einem Verteilungsvolumen von 0.5 l/kg in seinen Kenndaten mit 3 und 4 vergleichbar ist. Die Disposition des Wirkstoffes aus Plasma und Speichel verlief annähernd parallel. Ca. 2% der applizierten Dosis konnten im Urin unverändert nachgewiesen werden; der renal eliminierte Dosisanteil von Acetylaminophenazon (7) betrug 2.4% der verabreichten Dosis. Konjugiert mit dem Harn ausgeschiedenes Hydroxyphenazon (8) stellt mit mindestens 10.5% der Dosis einen quantitativ relevanten Metaboliten von 5 dar.
Im Gegensatz zum Absorptions- und Eliminationsverhalten, in dem 3, 4 und 5 vergleichbar sind, verläuft die Metabolisierung dieser drei Aminopyrazolinonderivate quantitativ offensichtlich unterschiedlich. Bei 3 und 4 werden die Hauptabbauprodukte durch C-4-Aminodesalkylierung, gefolgt von Acetylierung und Formylierung, gebildet. Andererseits werden hydroxy-

lierte Strukturen, wie sie vermehrt bei Phenazon (1) auftreten, nur zu geringem Anteil gefunden. Im Rahmen der Biotransformation von 5 treten beide metabolischen Reaktionstypen auf, wobei der oxidative, verglichen mit 3 und 4, größere Bedeutung hat.

In-vitro-Untersuchungen zum entzündungspharmakologischen Verhalten von 5 haben gezeigt, daß sowohl der Wirkstoff als auch sein Metabolit 8 vergleichsweise schwache Hemmstoffe des Cyclooxygenaseweges der Prostaglandinbiosynthese sind.
Am Modell des Carrageenin-induzierten Rattenpfotenödems war nach peroraler Gabe 8 jedoch 14-fach schwächer wirksam als 5.

Die Umsetzung von 5 mit Singulett-Sauerstoff ($^1O_2$) verlief schnell, quantitativ und einheitlich unter Bildung eines für derartige Reaktionen typischen Produktes 28, das in Form von vier Rotationsisomeren vorlag. Die Reaktivität von 5 mit $^1O_2$ könnte für die Erklärung des antiinflammatorischen Effektes von Bedeutung sein.

V. EXPERIMENTELLER TEIL

1. MESSGERÄTE UND ANALYTISCHE METHODEN

1.1. pH-Werte

Präzisions-pH-Meter (Fa. Knick, Berlin) in Verbindung mit Einstabmeßkette (Fa. Metrohm, Schweiz)
(Zur Eichung wurden Standardpufferlösungen der Fa. Merck, Darmstadt, verwendet.)

1.2. Schmelzpunkte

Mettler FP 1

1.3. ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Spektroskopie

270 MHz-NMR-Spectrometer WH, Fa. Bruker (Karlsruhe)
Lösungsmittel: $CDCl_3$ (Merck Nr. 3432)
$DMSO\text{-}d_6$ (Merck Nr. 3424)
CD_3OD (Merck Nr. 2915)
Interner Standard: Tetramethylsilan (TMS)
Die Angabe der chemischen Verschiebung erfolgt in ppm nach der δ_{TMS}-Skala.
Zur Standardisierung wurde entweder TMS dem Lösungsmittel direkt zugesetzt oder die bekannten Werte der chemischen Verschiebung der Resonanzsignale des jeweiligen Lösungsmittels zur indirekten Eichung der δ_{TMS}-Skala verwendet (z.B. ^{13}C-NMR-Spektren).

Die ^{13}C-NMR-Spektren wurden unter Protonen-Rauschentkopplung aufgenommen.

Verwendete Abkürzungen:
s: Singulett; d: Dublett; m: Multiplett

1.4. Massenspektrometrie

1.4.1. Elektronenstoßionisation

Die EI-Spektren wurden am Massenspektrometer MAT 711 (Varian MAT, Bremen) bei 80 eV (Elektronenenergie), 0.8 mA (Emission), 8 kV (Ionenbeschleunigung) und einer Auflösung von 2000 (10% rel. Tal-Definition) aufgenommen. Die Proben wurden direkt verdampft. Die Ionenquellentemperatur betrug 120° C.
Die jeweiligen Verdampfungstemperaturen sind den Abbildungen der Einzelspektren zu entnehmen. Bei der fraktionierten Verdampfung erfolgte eine Erhöhung der Verdampfungstemperatur im Bereich von 20- 400° C bei Konstanthaltung des Totalionenstroms (Gesamtzahl aller Ionen).

1.4.2. Hochauflösung

Die elementare Zusammensetzung wurde durch Massenfeinbestimmung am MAT 711 bei einer Auflösung von 13 000 (10% rel. Tal-Definition) ermittelt.

1.4.3. Chemische Ionisation

Die CI-Messungen wurden am Massenspektrometer MAT 112 S (Varian MAT, Bremen) mit Isobutan als Reaktandgas unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 80 eV, 0.7 mA, 800 V, 10^{-4} Torr, 200° C Ionenquellentemperatur.

Die Registrierung erfolgte bei den unter 1.4.1, 1.4.2 und 1.4.3. genannten Verfahren mit dem Datemsystem SS 100.

1.4.4. MS/MS-Untersuchungen

Für den Nachweis der Fragmentierungsfolgen von Molekül- und Fragmentionen wurden die Zerfälle im 2. feldfreien Bereich nach der DADI (direct analysis of daughter ions)-Methode[54] bestimmt.Das dem elektrischen Ablenkfeld vorgeschaltete Magnetfeld dient hierbei als Massenfilter. Die Untersuchungen wurden am Massenspektrometer CH 5 DF der Firma Varian MAT bei 70 eV, 0.7 mA, 3kV und einer Ionenquellentemperatur von 150° C

durchgeführt. Die Registrierung erfolgte durch Scannen der Ablenkspannung bei konstanter Ionenbeschleunigung und konstantem Magnetfeld.

1.4.5. Positve und negative "Fast-Atom-Bombardment"(FAB)-Ionisation[25,26]

Die (+)- und (-)-FAB-Spektren wurden am CH 5 DF (Varian MAT) mit einer modifizierten FAB-Quelle der Fa. AMD-Intectra aufgenommen. Als Reaktandgas diente Xenon; die Ionisierung erfolgte bei 0.3 µA und 3 kV Ionenbeschleunigung. Der Druck in der Ionenquelle betrug 5×10^{-4} Torr. Als Matrix diente Glycerin auf einem Kupfertarget. Die fokussierbare Nachbeschleunigungsspannung betrug 7 kV. Die Registrierung erfolgte über lichtempfindliches Papier.
(Negative Ionen wurden nachgewiesen durch Umfokussierung der Ionenquelle und damit verbundener Umkehr der Ionenbeschleunigung, Umpolung des magnetischen und elektrischen Analysatorfeldes und Umwandlung der negativen Ionen über eine spezielle fokussierbare Konversionsdynode, um die Empfindlichkeit bei negativem Betrieb zu erhöhen (Verstärkung 1 : 100 bezogen auf positiven Betrieb).)

1.5. Dünnschichtchromatographie

1.5.1. Analytische DC

Es wurden Fertigplatten Silica-Rapid F_{254} (Woelm Nr. 4824) mit einer Schichtdicke von 0.25 mm auf Glas (20 x 20 cm) verwendet.

1.5.2. Präparative DC

Es wurden Fertigplatten Kieselgel 60 F_{254} (Merck Nr. 5717) mit einer Schichtdicke von 2 mm auf Glas (20 x 20 cm) verwendet.

1.5.3. HPTLC

Es wurden Fertigplatten Kieselgel 60 F_{254} (Merck Nr. 5628) auf Glas (10 x 10 cm) verwendet.

1.5.4. Fließmittel

Chloroform	70	
Diethylether	30	[Volumenanteile]
Methanol	10	

1.5.5. Detektion

UV: $\lambda_1 = 254$ nm, $\lambda_2 = 336$ nm

1.6. Säulenchromatographie

1.6.1. Amberlite XAD 2®-Säulen

Glassäulen mit Fritte und Hahn
Innendurchmesser: 3 cm
Länge: 20 cm
Füllmaterial: 100 g Amberlite XAD 2®(Fa. Serva)
Zur Füllung wurde das Trägermaterial in Wasser suspendiert auf die Säule gebracht. Nach mehrmaligem Spülen mit destilliertem Wasser war die Säule verwendungsfähig und das Probenmaterial konnte direkt aufgegeben werden.

1.6.2. Extrelut 20®-Säulen

Extrelut 20®- Fertigsäulen (Merck Nr.11737)
Sollten Extrelut®-Extrakte zur anschließenden quantitativen Bestimmung (GC,HPLC: besonders hohe Reinheitsanforderungen) eingesetzt werden, wurden Glassäulen mit Fritte und Hahn (3 x 20 cm) mit einer entsprechenden Menge Trägermaterial aus Extrelut 20®-Nachfüllpackungen (Merck Nr.11738) gefüllt und verwendet.

1.7. Gaschromatographie (GC)

Die Untersuchungen wurden am Gaschromatographen F 22 der Firma Perkin Elmer (Bodenseewerk) durchgeführt.

Säule:

Material:	Glas
Länge:	2 feet
Innerer Durchmesser:	2 mm
Flüssige Phase:	0.5% Carbowachs 20 M, 0.5% SE 30
Stationäre Phase:	Gas Chrom Q

Trägergas: Stickstoff 28 ml/min (strömungsgeregelt)
Vordruck: 80 kPa bei 175° C

Detektion:

Methode:	Stickstoff-Detektor (N-FID)	
Brenngase:	Wasserstoff	(Vordruck: 80 kPa)
	Synthet. Luft	(Vordruck: 0.3 MPa)

Temperaturen:

a) isotherm

Injektor: 300° C
Detektor: 300° C
Säule: 175° C

b) Temperaturprogramm

Injektor: 250° C
Detektor: 250° C
Säule: von 175° C mit 6° C/min bis 220° C
(ohne Vorintervall)

Probeneingabe:

Volumen: 1 µl
Spritze: Hamilton, V_{max}: 10 µl
Solvens: Methanol

Schreiber: 2-Kanalschreiber 56 (Perkin Elmer)
Papiervorschub: 5 mm/min
range: 2 mV

Integrator: Computing Integrator M-1 (Perkin Elmer)

1.8. Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die HPLC wurde an einer Gerätekombination der Fa. Waters Ass. durchgeführt.

Absorbance-Detector: Modell 440
Injector: Modell USK
Pumpe: Modell 6000 A

Säule:

Länge:	25 cm
Innerer Durchmesser:	4,6 mm
Füllmaterial:	Nucleosil RP-18 (Fa.Macherey&Nagel)
Korngröße:	5 µm

Detektion:

UV: $\lambda = 254$ nm

Fließmittel:

	Volumenanteile
System A: CH_3OH/H_2O	70 : 30
System B: CH_3OH/H_2O	50 : 50
System C: CH_3OH/H_2O	40 : 60
System D: CH_3OH/H_2O	30 : 70

Fließgeschwindigkeit: 1ml/min

Injektionsvolumen: 20 µl (dosiert mit Hamilton-Spritze, $V_{max} = 100$ µl)

Schreiber: 2-Kanalschreiber 56 (Perkin Elmer)
Papiervorschub: 1 cm/min

1.9. Apparatur zur Erzeugung von Singulett-Sauerstoff[20)]

Die Bestrahlungsapparatur bestand aus einem 25 cm hohen (Durchmesser: 12 cm) Glaszylinder. Die Apparatur wurde durch einen Außenmantel mit Wasser gekühlt. Durch ein Einleitungsrohr mit einer G3-Fritte am Ende wurde ein kontinuierlicher Sauerstoffstrom in die entsprechende Lösung eingeleitet. Der Reaktionsansatz wurde von außen mit zwei 300 W Photolampen der Fa. Osram bestrahlt.

2. CHEMIKALIEN

Alle verwendeten Chemikalien entsprachen höchstem analytischen Reinheitsgrad.
Alle eingesetzten Lösungsmittel waren entweder Nanograde®-Solventien der Fa. Promochem, Wesel, oder Uvasol®-Solventien der Fa. Merck, Darmstadt.
Die angegebenen Pufferlösungen wurden entweder nach Literaturdaten[55] oder unter Verwendung von Titrisol®-Ampullen der Fa. Merck hergestellt und vor ihrer Verwendung stets bzgl. ihres pH-Wertes geprüft.
In dieser Arbeit wird mit "Wasser" oder "H_2O" stets demineralisiertes Wasser bezeichnet; für die HPLC-Untersuchungen wurde doppelt destilliertes Wasser verwendet.

Pufferlösungen

pH 4.0: Eine Titrisol®-Ampulle (Merck Nr. 9884) wurde mit H_2O auf 500.0 ml verdünnt (Citrat-HCl-Puffer).

pH 6.2: 830.0 ml 1/15 M Kaliumdihydrogenphosphatlösung (9.073 g KH_2PO_4 (Merck Nr. 4881) auf 1000.0 ml H_2O) werden mit 170.0 ml 1/15 M Dinatriumphosphatlösung (11.87 g Na_2HPO_4 (Merck Nr. 6589) auf 1000.0 ml H_2O) versetzt.

pH 7.4: 197.0 ml 1/15 M KH_2PO_4-Lösung (s.o.) werden mit 803.0 ml 1/15 M Na_2HPO_4-Lösung (s.o.) versetzt.

pH 9.0: Eine Titrisol®-Ampulle (Merck Nr. 9889) wurde mit H_2O auf 500.0 ml verdünnt (Borsäure/Kaliumchlorid-Natronlauge-Puffer)

pH 11.0: Eine Titrisol®-Ampulle (Merck Nr. 9880) wurde mit H_2O auf 500.0 ml verdünnt (Borat-Natronlauge-Puffer).

3. PROBENGEWINNUNG (BIOLOGISCHES MATERIAL)

Für die qualitativen Untersuchungen zum Metabolismus von 5 wurden je 1g Isopropylaminophenazon-Base (5), für die kinetischen Bestimmungen je 1 g Isopropylaminophenazon-HCl (5-HCl) (≙ 870 mg 5) mit 50-100 ml Wasser peroral eingenommen.

3.1. Harnproben

Der Harn wurde über 60 h p.appl. fraktioniert gesammelt, bis zur Aufarbeitung bei -20° C tiefgefroren und jeweils ein Aliquot zur Analyse eingesetzt.
Als Leerharnprobe diente stets ein Morgenharn medikationsfreier Probanden.

3.2. Plasmaproben

Zu definierten Zeitpunkten (vgl. S. 146) p.appl. wurden aus der linken Cubitalvene je 10 ml Vollblut in Monovetten® mit Gerinnungshemmstoff abgenommen. Diese Proben wurden nach sofortigem Zentrifugieren (4 000 Upm, 15 min.) dekantiert und das Plasma bei -20° C tiefgefroren.
Ein Leerplasma wurde 1 h vor der Arzneistoffgabe unter gleichen Bedingungen gewonnen.

3.3. Speichelproben

In definierten Zeitabständen (vgl. S. 146) wurden durch Simulation des Kauvorganges je 2 ml Speichel gewonnen und sofort bei -20° C tiefgefroren.
Ein Leerspeichel wurde 1 h vor Applikation des Arzneistoffes entsprechend erhalten.

3.4. Probanden

Für die Untersuchungen zur Metabolisierung von 5 standen drei freiwillige Probanden zur Verfügung (s. S. 127).
Zwei Wochen vor und während der Versuchsdauer erfolgte keine Sekundärmedikation; die einzelnen Versuchsreihen wurden im minimalen Abstand von zwei Wochen durchgeführt.

	Geschlecht	Alter	Gewicht	Raucher
Proband 1	f	25 Jahre	52 kg	+
Proband 2	f	38 Jahre	60 kg	+
Proband 3	m	24 Jahre	76 kg	-

In der Anamnese der Probanden ergaben sich keine Anhaltspunkte für Funktionsstörungen der Leber bzw. Nieren. Während der Versuche wurde auf die Einnahme coffeinhaltiger Getränke verzichtet.
An den qualitativen Untersuchungen zur Metabolisierung nahmen alle drei Probanden je viermal teil. Im Rahmen der Studien zur Rubazon (26)- bzw. Methylrubazonsäure(27)-Bildung wurde jedes der drei untersuchten 4-Aminopyrazolinone (3, 4 und 5) von jedem Probanden jeweils einmal im entsprechenden zeitlichen Abstand eingenommen. An den kinetischen Untersuchungen nahm ausschließlich der Proband 1 teil.

4. AUFARBEITUNG VON HARNPROBEN ZUR ISOLIERUNG UND IDENTIFIZIERUNG VON 5 UND SEINEN METABOLITEN

4.1. Direktextraktion

100 ml Harn wurden
a) nativ (pH 5,5 - 6,5) und
b) bei pH 9,0 (nach Zusatz des entsprechenden Puffers und ggf. gesättigter wäßriger Natriumcarbonatlösung)
je dreimal mit 100 ml Chloroform im Scheidetrichter durch zehnminütiges Schütteln extrahiert. Nach Zentrifugieren und Filtration über ein hydrophobiertes Filter (Fa. Schleicher & Schüll) wurden die organischen Phasen vereinigt und am Vakuumrotationsverdampfer unter möglichst geringer thermischer Belastung zur Trockne gebracht. Für die folgenden Untersuchungen wurde die Probe in 200 µl Methanol aufgenommen.

Von dieser methanolischen Lösung wurden
a) 10 µl im Vergleich zu Referenzsubstanzen und Leerharnextrakten jeweils punktförmig auf eine analytische DC-Platte (s. S. 121) oder
b) 100 µl bandförmig auf eine präparative DC-Platte (s. S. 121) aufgetragen.
Die Chromatogramme wurden in dem unter 1.5.4. beschriebenen Fließmittel entwickelt.
Aufgrund des Vergleiches bei der analytischen DC konnten Zonen, in denen das Vorhandensein von Metaboliten wahrscheinlich war, zugeordnet werden. Die bandförmigen Zonen der entsprechenden Rf- bzw. Rx-Werte (vgl. hierzu auch S. 16) wurden von der präparativen DC-Platte abgetrennt, das Trägermaterial mit Methanol eluiert, über eine D3-Fritte filtriert und schonend zur Trockne eingeengt.
Die so erhaltenen Proben wurden
a) ^{1}H-NMR-spektroskopisch (s. S. 119) und
b) mit den unter 1.4.1 - 1.4.4. beschriebenen massenspektrometrischen Verfahren
untersucht.

4.2. Enzymatische Hydrolyse

100 ml Harn wurden durch Zugabe von Pufferlösung (s. S. 125) auf pH 6,2 gebracht und mit 1 ml Enzymsuspension ß-Glucuronidase/Arylsulfatase (Merck Nr.4114) versetzt. Der Ansatz wurde für 3,5 bzw. 8 h bei einer Temperatur von 37° C im Temperierbad inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit je 100 ml Chloroform extrahiert und wie unter 4.1. beschrieben weiterbearbeitet.

4.3. Saure Hydrolyse

100 ml Harn wurden mit 6 N HCl auf pH 1 gebracht und im Wasserbad bei 100° C 15 Minuten hydrolysiert. Der pH-Wert wurde sodann mit 6 N NaOH wieder in den neutralen pH-Bereich zurückgestellt. Danach wurde der Ansatz dreimal mit je 100 ml Chloroform ausgeschüttelt und wie unter 4.1. beschrieben weiterbearbeitet.

4.4. XAD-Extraktion[56,57)]

15 mg Urease (Boehringer,Mannheim, Nr.127442) wurden in 100 ml Harn gelöst und der Ansatz für 8 h im Temperierbad bei einer Temperatur von 25° C inkubiert. Die auftretende pH-Verschiebung in den alkalischen Bereich (pH ca. 9) wurde durch Zugabe von 0.1 N HCl zu 7.0 kompensiert. Die Harnprobe wurde auf eine mit destilliertem Wasser vorbehandelte Amberlite XAD 2®-Glassäule (s. S. 122) aufgebracht und das wäßrige Eluat mehrfach über die Säule perkoliert (ca. 45 min.). Anschließend wurden 200 ml destilliertes Wasser über die Säule gegeben und das Eluat verworfen. Zur Extraktion der Biotransformationsprodukte wurden sodann 300 ml Methanol verwendet. Der erhaltene Extrakt wurde am Vakuumrotationsverdampfer auf ein Restvolumen von etwa 1 ml konzentriert.
Diese Probe wurde unverzüglich in der Ionenquelle des Hochauflösungsmassenspektrometers verdampft und untersucht.

4.5. Methanol-Extraktion[24)]

100 ml Harn wurden zunächst,wie unter 4.4. beschrieben, mit Urease inkubiert und der pH-Wert zu 7.0 kompensiert.
Der Harn wurde anschließend mit der gleichen Menge Ethanol versetzt und das Gemisch am Vakuumrotationsverdampfer eingeengt. Der Rückstand wurde im Stickstoffstrom nachgetrocknet und dann zweimal mit 50 ml Methanol digeriert. Diese Methanolextrakte wurden filtriert und bei 4° C im Kühlschrank für 24 h aufbewahrt. Nach erneuter Filtration wurden die Extrakte auf 1 ml am Vakuumrotationsverdampfer konzentriert und direkt in der Ionenquelle des Hochauflösungsmassenspektrometers verdampft und untersucht.

5. IDENTIFIZIERUNG VON RUBAZONSÄURE (26) UND METHYLRUBAZONSÄURE (27) IN HARNEN NACH EINNAHME VON DIMETHYLAMINOPHENAZON (3), NORAMIDOPYRINMETHANSULFONAT-NA (4) BZW. ISOPROPYLAMINOPHENAZON (5)

Harne nach Einnahme von 1 g des entsprechenden 4-Aminopyrazolinon wurden fraktioniert gesammelt. Ein Aliquot der Proben (10 ml) wurde

a) sofort bei Harn-pH direkt extrahiert (vgl. S. 127, 4.1.),
b) nach 24- bzw. 48-stündigem Stehenlassen bei Tageslichtexposition wie unter a) beschrieben extrahiert bzw.
c) nach enzymatischer Hydrolyse gemäß 4.2. (S. 128) und
d) nach saurer Hydrolyse gemäß 4.3. (S.128)

aufgearbeitet.
Zur qualitativen Prüfung des Vorliegens von 26 und 27 wurden jeweils 5 µl des entsprechenden methanolischen Konzentrates auf HPTLC-Platten aufgetragen und im DC-Fließmittel (s. S. 122) entwickelt. Zu Vergleichszwecken wurden Referenzsubstanzen von 26 und 27 chromatographiert.

6. ALLGEMEINE GASCHROMATOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNGEN

Die im folgenden beschriebenen gaschromatographischen Bestimmungen wurden unter isothermen Bedingungen (vgl. S.123) durchgeführt. Alle Konzentrationen wurden durch Peakflächenauswertung mit Hilfe eines Integrators (s. S. 123) ermittelt.
Zur Optimierung und Charakterisierung des gaschromatographischen Analysenverfahrens wurden methanolische Standardlösungen von 5 mit 50 mg 5/100 ml bzw. 10 mg 5/100 ml verwendet.
Die Linearität der Stickstoff-Detektor-Response wurde mit einer Verdünnungsreihe dieser Standardlösungen im Konzentrationsbereich von 50-0.1 mg 5/100 ml (≙ 500-1 ng 5/1 µl) überprüft.
Der Einspritzfehler wurde durch Berechnung des Variationskoeffizienten der Peakflächen nach wiederholter Injektion definierter Standardlösungen von 5 ermittelt.
Vom internen Standard Dimethylaminophenazon (3) wurden methanolische Lösungen mit 10 mg 3/100 ml verwendet. Zur Bestimmung des Response-Faktors wurden Mischungen der entsprechenden Standardlösungen von 3 und 5 injiziert.

Der Response-Faktor (F) wurde gemäß

$$F = \frac{C_{(5)} \cdot A_{(3)}}{C_{(3)} \cdot A_{(5)}}$$ ermittelt.

C: Konzentration [ng/µl]
A: Peakfläche [Integratoreinheiten]

Zur Testung der Stabilität von 5 in unterschiedlichen organischen Solventien wurden Standardlösungen von 5 von 1 mg 5/1 ml in Toluol, n-Hexan, n-Heptan, Methanol, Chloroform und Ethylacetat verwendet. Diese wurden in lichtdurchlässigen sowie alternativ in lichtgeschützten Glasbehältnissen aufbewahrt und in definierten Zeitabständen (1,2,3,4,5,10,24 und 48 h) wiederholt analysiert. Zur Prüfung der Stabilität bei thermischer Belastung wurden die Proben für jeweils 3 h bei 40° C, 50° C, 60° C und 70° C im Temperierbad aufbewahrt und nachfolgend gaschromatographisch untersucht.

7. BIOANALYTISCHE VERFAHREN

7.1. Bestimmung der Wiederfindungsraten von 5 aus biologischem Material nach Extraktion

Leerproben von 10 ml Harn, 1 ml Plasma und 1 ml Speichel wurden mit definierten methanolischen Standardlösungen von 5 (400 µl) versetzt, der pH-Wert der Probe mit Pufferlösung (s. S. 125) entsprechend eingestellt und mit gesättigter KCl auf 20 ml aufgefüllt.

a) Flüssig-Flüssig-Extraktion

20 ml der oben genannten und auf pH 11 eingestellten Harnproben wurden im Scheidetrichter mit einem gleichen Volumen Chloroform versetzt und mit Hilfe einer Schüttelmaschine (Frequenz 30/min) 10 min extrahiert. (Die Extraktion wurde entweder ein-, zwei- oder dreimal mit der gleichen Menge Chloroform vorgenommen.) Die organische Phase wurde nach Filtration über ein hydrophobiertes Filter (Fa. Schleicher & Schüll) am Vakuumrotationsverdampfer eingeengt. Der Rückstand wurde in 400 µl einer

definierten methanolischen Standardlösung von Dimethylaminophenazon (3) aufgenommen und ein Aliquot zur Analyse eingesetzt.

b) Extrelut®-Extraktion

Für die Extrelut®-Extraktion wurden Harnproben mit einem pH-Wert von 4,7.4,9 und 11, Speichel- und Plasmaproben mit einem pH-Wert von 11 wie oben beschrieben vorbereitet. 20 ml der jeweiligen wäßrigen Phase wurden auf eine Extrelut®-Fertigsäule aufgebracht und nach einer Äquilibrierungszeit von 20 min mit 40 ml Chloroform eluiert. Das Eluat wurde zur Trockne eingeengt, der Rückstand in 400 µl einer methanolischen Standardlösung von 3 aufgenommen und ein Aliquot zur Analyse eingesetzt.

7.2. Aufarbeitung von Harnproben zur quantitativen Bestimmung von 5 und seinen Metaboliten

Jeweils 10 ml der Harne nach Einnahme von 5-HCl wurden mit Pufferlösung auf pH 9 eingestellt, mit gesättigter KCl-Lösung auf 20 ml verdünnt, auf eine Extrelut®-Fertigsäule bzw. auf eine mit Extrelut®-Füllmaterial entsprechend hergestellte Glassäule (s. S. 122, 1.6.2.) aufgebracht, 20 min äquilibriert und mit 40 ml Chloroform extrahiert. Das Eluat wurde zur Trockne eingeengt und in 400 µl Methanol aufgenommen. Je 20-100 µl dieser Lösung wurden zur HPLC-Analyse eingesetzt.

Jeweils 20 ml derselben Harne wurden zunächst enzymatisch, wie unter 4.2. (S.128) beschrieben, mit 0.2 ml ß-Glucuronidase/Arylsulfatase gespalten. Anschließend wurden 10 ml des Harnes nach Konjugatspaltung mit Pufferlösung auf pH 4 gebracht, mit gesättigter KCl-Lösung auf 20 ml verdünnt, über Extrelut®-Säulen, wie oben beschrieben, mit Chloroform eluiert und je 20-100 µl dieser Lösung der HPLC-Analyse unterzogen.

7.3. HPLC-Bestimmung von 5 und seinen Metaboliten im Harn

Die gemäß 7.2. (S. 132) aufgearbeiteten Harnproben wurden mit Hilfe der HPLC auf das Vorliegen von Isopropylaminophenazon (5), Aminophenazon (6), Acetylaminophenazon (7) und Hydroxyphenazon (8) geprüft und ggf. die entsprechenden Verbindungen durch externe Standardisierung quantitativ bestimmt.
(Als externe Standards dienten definierte methanolische Lösungen von 5,6,7 und 8.)
Zunächst wurden die Harnextrakte vor enzymatischer Spaltung geprüft:

1) Das Vorliegen von 6 und evtl. unkonjugiert vorliegendem 8 wurde unter Verwendung des Fließmittelsystems C (s. S.124) untersucht.
2) 7 wurde unter Verwendung des Fließmittelsystems B (s. S.124) identifiziert und quantifiziert.
3) 5 wurde unter Verwendung des Fließmittelsystems A (s. S.124) identifiziert und quantifiziert.

In den Harnextrakten nach Konjugatspaltung wurde 8 unter Verwendung des Fließmittelsystems B identifiziert und quantifiziert.

7.4. Aufarbeitung von Plasmaproben zur Quantifizierung von 5

Jeweils 400 µl der entsprechenden Plasmaproben (s. S. 126, 3.2.) wurden mit 600 µl Acetonitril (Eiweißfällung) in verschließbaren 2 ml-Plastikröhrchen für 1 min mittels Vortex gemischt, 10 min stehen gelassen und erneut 1 min gemischt. Die Probe wurde anschließend 10 min bei 4 000 Upm zentrifugiert und der Überstand abpipettiert.
Jeweils 20 µl wurden zur HPLC-Analyse eingesetzt.

7.5. Aufarbeitung von Speichelproben zur Quantifizierung von 5

Jeweils 400 µl der entsprechenden Speichelproben (s. S. 126, 3.3.) wurden mit 400 µl Methanol verdünnt, 1 min mittels Vortex gemischt und anschließend bei 4 000 Upm zentrifugiert.
Der Überstand wurde abpipettiert und je 20 µl zur HPLC-Analyse eingesetzt.

7.6. HPLC-Bestimmung von 5 in Plasma und Speichel

Die allgemeinen HPLC-Bedingungen sind auf S. 124 beschrieben. Jeweils 20 µl der gemäß 7.4. und 7.5. (S. 133) aufgearbeiteten Proben wurden direkt im Fließmittel A chromatographiert. Die Quantifizierung von 5 erfolgte durch externe Standardisierung mit zuvor hergestellten definierten methanolischen Standardlösungen von 5.

8. BERECHNUNG PHARMAKOKINETISCHER PARAMETER

Die Werte des maximalen Plasmaspiegels (c_{max}) und seines Zeitpunktes (t_{max}) wurden der linearen Darstellung von c vs. t entnommen. Zur Berechnung des Anteils im Gesamtplasma wurde für den Menschen das Gesamtplasmavolumen mit 42 ml/kg angenommen[58].
Die Eliminationsgeschwindigkeitskonstante (k_{el}) wurde durch Regressionsrechnung aus dem terminalen linearen Abschnitt des Konzentrations-Zeit-Profils ermittelt. Aus der graphischen Darstellung von lg c vs. t kann k_{el} als Steigung der Geraden, die die Meßpunkte verbindet, entnommen werden.
Die Eliminationshalbwertzeit ($t_{1/2\,el}$) ergab sich nach:

$$t_{1/2\,el} = \frac{\ln 2}{k_{el}} .$$

Die Fläche unter dem Plasmaspiegel (AUC - area under the curve -) wurde mit Hilfe der Trapezregel berechnet:

$$AUC = \int_0^t c_p(t)\, dt. \qquad c_p(t): \text{Plasmaspiegel zum Zeitpunkt t}$$

Der AUC-Wert entspricht dem 0. Moment (S_o) der Plasmakinetik. Zur Berechnung der mittleren Verweilzeit (MRT) mußte zusätzlich das 1. Moment (S_1) als

$$S_1 = \int_0^t t \cdot c_p(t)\, dt$$ berechnet werden.

Die mittlere Verweilzeit errechnet sich aus dem Quotienten von S_1 und S_o.

Das Verteilungsvolumen (V_d) wurde aus dem Verhältnis von Dosis (D) und der extrapolierten fiktiven Anfangskonzentration von **5** zum Zeitpunkt t = 0 ($c_p(0)$) bestimmt:

$$V_d = \frac{D \cdot F}{c_p(0)}$$

F - Absorptionsfaktor (= 1) (s.u.)

Um den Vergleich mit Literaturdaten anderer Pyrazolinonderivate zu ermöglichen, wurde V_d auf das Körpergewicht normiert und in l/kg angegeben.

Die totale Clearance (Cl_t) wurde als

$$Cl_t = \frac{D \cdot F}{AUC}$$

ermittelt.

Zur Berechnung von V_d und Cl_t wurde eine vollständige enterale Absorption von **5** vorausgesetzt (vgl. S. 89) und der Faktor F = 1 angenommen.

Zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten und der Halbwertzeiten der renalen Ausscheidung wurde die Darstellungsform des Sigma-Minus-Plot verwendet[59]. Dazu wurde die Differenz aus gesamtausgeschiedenem Dosisanteil (U_∞ bzw. U_{kum}) und der zum Zeitpunkt t ausgeschiedenen Substanzmenge (U_t) gebildet und diese semilogarithmisch gegen t aufgetragen (vgl. Abb. 31 , S. 92). Die Eliminationsgeschwindigkeitskonstante (k_{el}) wurde durch Regressionsrechnung aus dem terminalen linearen Abschnitt bzw. als Steigung der Verbindungsgeraden der Meßpunkte ermittelt. Die Eliminationshalbwertzeit ($t_{1/2\,el}$) wurde auch hier nach:

$$t_{1/2\,el} = \frac{\ln 2}{k_{el}}$$

berechnet.

Die renale Clearance (Cl_r) wurde aus der Gesamtmenge des renal eliminierten Wirkstoffes (U_∞) und dem AUC-Wert des Plasmaspiegels wie folgt ermittelt:

$$Cl_r = \frac{U_\infty}{AUC} \quad .$$

Die nicht-renale Clearance (Cl_{nr}) ergab sich aus der Differenz von totaler und renaler Clearance:

$$Cl_{nr} = Cl_t - Cl_r \quad .$$

Die hepatische Extraktionsquote (Q_h) wurde unter Berücksichtigung des hepatischen Plasmaflusses von 820 ml/min beim Menschen berechnet:

$$Q_h = \frac{Cl_{nr}}{\text{hepatischer Plasmafluß}} \quad .$$

Die Meßwerte der Konzentrationsbestimmungen von 5 in Plasma, Speichel und Urin sowie von 7 und 8 im Urin sind im Anhang auf S.146 angegeben.

9. IN-VITRO-UNTERSUCHUNGEN ZUR HEMMUNG DER PROSTAGLANDINSYNTHASE *

Die Untersuchungen wurden nach einem von Baumann et al. beschriebenen Verfahren[61,62] durchgeführt.
An Rattennierenmarkspräparationen wurde die Prostaglandinsynthaseinhibition durch Phenazon (1), Isopropylaminophenazon (5) und Hydroxyphenazon (8) getestet.

10. HEMMUNG DES CARRAGEENIN-INDUZIERTEN RATTENPFOTENÖDEMS **

10.1. Tiere

♀ Sprague-Dawley-Ratten, CAW-ICO-WIGA, 140-180 g

10.2. Tierhaltung

Jeweils fünf Tiere pro Makrolon®-Käfig Typ III wurden bei ca. 24° C gehalten.
(Markierung der Tiere mittels Filzschreiber (Schwanz))
Zur Ernährung der Tiere wurde Altromin® R und Wasser ad libitum verwendet.

10.3. Versuchsdurchführung

Die Ödemprovokation erfolgte bei Ratten (10 Tiere/Dosis pro Versuchsansatz; Futterentzug ca. 16 h vor Versuchsbeginn) durch subplantare Injektion (rechte Hinterpfote) von 0.05 ml/Tier einer 1%-igen Carrageenin-Suspension (Type XM, Charge 1 F 7/76, Krafft Foods, Chicago, I11.). Das Pfotenvolumen jeder Ratte (jeweils 2-3 Einzelmessungen) wurde vor sowie im stündlichen Abstand im Versuchszeitraum von 1-6 h nach Ödemprovokation bestimmt. Die Substanzgabe erfolgte 1 h vor Ödemprovokation p.o. . Hydroxyphenazon (8) wurde im Dosisbereich von 100-1000 mg/kg als Suspension in 1%-iger Carboxymethylcellulose, Isopropylaminophenazon (5) im Dosisbereich von 30-300 mg/kg als wässrige

---

*,** Herrn Dr.med.habil. J. Baumann* (Pharmakologisches Institut der FU Berlin) und Herr Dr. Riedel** (Pharmakologische Abteilung der Fa. Byk Gulden, Konstanz) danke ich für die Durchführung der Versuche.

Lösung des Hydrochlorids verabreicht. (Die angegebene Dosis von 5 bezieht sich auf die freie Base.)
Die zu den genannten Zeiten nach der Substanzapplikation ermittelte druchschnittliche absolute Pfotenschwellung jeder behandelten Gruppe wurde auf diejenige einer unbehandelten Kontrollgruppe (≙ 100%; physiologische NaCl-Lösung) bezogen. Als Maß für die antiphlogistische Wirkung diente die maximale prozentuale Ödemhemmung im Verlauf von 2-7 h nach Substanzgabe.
Die Bestimmung des Pfotenvolumens erfolgte plethysmometrisch: Das durch die Rattenpfote verdrängte Flüssigkeitsvolumen wurde über einen elektromechanischen Druckwandler (Statham P 23 V, 0-26,7 kPa) digital registriert.
Die angegebenen Dosen der getesteten Substanzen wurden in einem Flüssigkeitsvolumen von 20 ml/kg p.o. verabreicht.

10.4. Biometrie

Die Prüfung auf Signifikanz der Mittelwertsunterschiede wurde anhand des Student-Welch-Tests (p einseitig bestimmt) vorgenommen. Die ED_{50}-Werte wurden logarithmisch interpoliert.

11. UMSETZUNG VON ISOPROPYLAMINOPHENAZON (5) MIT SINGULETT-SAUERSTOFF (ISOLIERUNG UND IDENTIFIZIERUNG DES REAKTIONSPRODUKTES)

a) 1 g 5 und 100 mg des Sensibilisators Methylenblau wurden in 600 ml Phosphat-Puffer pH 7.4 (s. S. 124) gelöst und in die unter 1.9.,S.125, beschriebene Apparatur eingebracht. Nach 15-minütiger Sauerstoffsättigung des Reaktionsansatzes wurde dieser von außen mit 300 W bestrahlt.
Der Verlauf der Reaktion wurde in 30-minütigem Abstand dünnschichtchromatographisch auf HPTLC-Platten (Fließmittel s. S. 122) geprüft. (Der R_x-Wert des Reaktionsproduktes (28) betrug 1.10 bezogen auf R_x(5) = 1.00 .)
b) Nach quantitativer Umsetzung des Ausgangsproduktes 5 zu einem einheitlichen Reaktionsprodukt 28 - Versuchsdauer 3 h -, wurden 100 ml der Pufferlösung zweimal mit gleichen Teilen

Chloroform ausgeschüttelt und die vereinigten organischen Phasen am Vakuumrotationsverdampfer zunächst auf ca. 50 ml eingeengt. Zur weitestgehenden Entfernung des in die organische Phase übergegangenen Methylenblauanteils wurde diese zweimal mit je 50 ml Wasser reextrahiert. Die wässrigen Phasen wurden verworfen und der Chloroformextrakt nahezu bis zur Trockne eingeengt. Setzt man diesem Konzentrat eine geringe Menge Diethylether zu, so kristallisiert 2,5,6-Triketo-3,8-dimethyl-4-phenyl-3,4,7-triazanonan (28) in farblosen Nadeln. Nach Filtration über eine D3-Fritte wurde das Produkt mit wenig Diethylether gewaschen und unter Stickstoff getrocknet.

c) Unter Zusatz von 1 g DABCO®(Merck Nr. 803456) wurde die Reaktion gemäß den unter a) beschriebenen Bedingungen wiederholt (Singulett-Sauerstoff-Quenching).

MS (120° C, 80 eV):

EI: m/z (rel. Int.[%])= 277 (M^+, 4.0), 235 (6.8), 192 (9.2), 191 (68.2), 165 (7.1), 164 (56.3), 149 (6.8), 123 (8.8), 122 (95.3), 121 (100.0), 120 (3.1), 119 (12.8), 107 (13.3), 105 (3.7), 93 (7.7), 92 (21.2), 91 (9.3), 86 (4.6), 78 (3.6), 77 (23.9), 73 (5.2), 65 (8.5), 64 (3.5), 56 (8.9), 51 (6.5), 43 (49.5).

^1H- und ^{13}C-NMR: s. S. 104 ff.

12. REFERENZSUBSTANZEN

12.1. Acetylaminophenazon (7)

0.1 Mol Aminophenazon (6) (s.u.) und 0.3 Mol Acetanhydrid wurden in 200 ml Ethanol gelöst und bei Raumtemperatur 1 h lang gerührt. Im Verlauf der Reaktion kristallisierte ein farbloses Produkt aus, das nach Filtration mit Ethanol gewaschen, getrocknet (N_2) und aus Ethylacetat/Eisessig (10:1) umkristallisiert wurde.

Schmelzpunkt: 197° C

MS (180° C, 80 eV):

EI: m/z (rel. Int.[%])= 245 (M^+, 40.8), 203 (28.0), 147 (0.8), 119 (2.1), 91 (5.2), 84 (77.8), 77 (10.1), 56 (100.0), 43 (29.6).

Die CI-Analyse lieferte unter gleichen Bedingungen protonierte Molekülradikalionen bei m/z 246 mit einer relativen Intensität von 100.0 %.

^{1}H-NMR: s. Abb. 16, S. 36

12.2. Aminophenazon (6)

Die Verbindung wurde von Fa. Merck, Darmstadt (Nr. 7293) bezogen.

MS (100°C, 80 eV):

EI: m/z (rel. Int.[%])= 203 (M^+, 56.0), 147 (1.6), 119 (4.4) 93 (7.2), 91 (7.2), 84 (73.6), 77 (24.4), 56 (100.0), 42 (73.8).

Die CI-Analyse lieferte unter gleichen Bedingungen protonierte Molekülradikalionen bei m/z 204 mit einer relativen Intensität von 100.0 %.

12.3. Dimethylaminophenazon (3)

Die Verbindung wurde von Fa. Merck, Darmstadt (Nr. 7454) bezogen.

MS (150° C, 80 eV)

EI: m/z (rel. Int.[%])= 231 (M^{+}, 47.3), 216 (2.6), 159 (2.2), 147 (4.0), 137 (2.7), 132 (7.1), 119 (14.3), 111 (13.4), 97 (40.2), 91 (17.9), 82 (8.9), 77 (23.2), 56 (100.0), 42 (16.1).

Die CI-Analyse lieferte unter gleichen Bedingungen protonierte Molekülradikalionen bei m/z 232 mit einer relativen Intensität von 100.0 %.

12.4. Formylaminophenazon (11)

Die Verbindung wurde von der Fa. Hoechst, Frankfurt/Main zur Verfügung gestellt.

MS (150°C, 80 eV)

EI: m/z (rel. Int.[%])= 231 (M^{+}, 25.8), 203 (28.9), 119 (7.2), 91 (13.4), 84 (34.0), 83 (26.8), 77 (15.5), 56 (100.0), 42 (16.5).

Die CI- Analyse lieferte unter gleichen Bedingungen protonierte Molekülradikalionen bei m/z 232 mit einer relativen Intensität von 100.0 %.

12.5. Hydroxyphenazon (8)

Die Verbindung wurde in Anlehnung an die Vorschriften von Voigt[22] und Bockmühl[63] synthetisiert.
25 g Dimethylaminophenazon (3)wurden in 550 ml Wasser gelöst und mit 17 ml konz. HCl versetzt. Unter Eiskühlung ließ man

eine Lösung von 8 g Natriumnitrit in 50 ml Wasser langsam zutropfen. Nach nochmaligem Zusatz von 15 ml verd. HCl wurde der Ansatz über Nacht stehen gelassen.
Die ausgeschiedenen Kristalle wurden abfiltriert, mit Wasser gewaschen, sofort in eine Lösung von 17 g Natriumhydrogensulfit in 200 ml Wasser gegeben und darin auf dem Wasserbad gelöst. Aus dieser Lösung kristallisierte **8** nach ca. 1-wöchiger Aufbewahrung im Kühlschrank (bei ca. 4° C) aus. Nach mehrmaligem Waschen mit geringen Volumina von Wasser (10 ml) wurde getrocknet und aus $CHCl_3/Et_2O$ (2:1) umkristallisiert.

Die Darstellung von **8** aus zuvor synthetisiertem 1-Phenyl-2.3-dimethyl-4-brompyrazolin-5-on[66] nach Knorr[65] gelang nicht. Dabei wurden 900 mg 1-Phenyl-2.3-dimethyl-4-brompyrazolin-5-on mit 20 ml einer Lösung von 4 g Kaliumhydroxid in 20 ml Wasser unter Rückfluß gekocht, bis die Ausgangssubstanz vollständig gelöst war. Beim Neutralisieren der alkalischen Lösung sollte **8** ausfallen. Dies konnte nicht beobachtet werden (vgl. zur Stabilität von **8** in alkalischen Lösungen auch [34]).

Schmelzpunkt: 181° C

MS (40° C, 80 eV)

EI: m/z (rel. Int.[%])= 204 (M^+, 6.0), 176 (2.1), 120 (3.2), 91 (4.1), 77 (12.2), 56 (100.0), 42 (24.2).

Die CI-Analyse lieferte unter gleichen Bedingungen protonierte Molekülradikalionen bei m/z 205 mit einer relativen Intensität von 100.0 %.

^{1}H-NMR: s. Abb. 17, S. 36

12.6. Isopropylaminophenazon (5)

Die Verbindung wurde von der Fa. Byk-Gulden, Konstanz zur Verfügung gestellt.

MS (180° C, 80 eV)

EI: m/z (rel. Int.[%])= 245 ($M^{+\cdot}$,23.2), 230 (10.6), 202 (2.4), 137 (35.2), 121 (4.4), 91 (4.4), 83 (31.0), 77 (7.4), 56 (100.0), 43 (14.2).

Die CI-Analyse lieferte unter gleichen Bedingungen protonierte Molekülradikalionen bei m/z 246 mit einer relativen Intensität von 100.0 %.

12.7. Monomethylaminophenazon (9)

Die Verbindung wurde von der Fa. Byk-Gulden, Konstanz zur Verfügung gestellt.

MS (40° C, 80 eV)

EI: m/z (rel. Int[%])= 217 ($M^{+\cdot}$, 16.8), 202 (1.1), 161 (0.6), 148 (1.1), 123 (6.6), 119 (2.9), 98 (10.5), 84 (4.6), 83 (54.5), 77 (19.0), 56 (100.0), 42 (41.1).

Die CI-Analyse lieferte unter gleichen Bedingungen protonierte Molekülradikalionen bei m/z 218 mit einer relativen Intensität von 100.0 %.

12.8. Noramidopyrinmethansulfonat-Natrium (4)

Die Verbindung wurde von der Fa. Hoechst, Frankfurt/Main bezogen.

MS (290° C, 80 eV)

EI: m/z (rel. Int[%])= 231 ($C_{13}H_{17}N_3O$, 23.1), 230 ($C_{13}H_{16}N_3O$, 87.1), 217 ($C_{12}H_{15}N_3O$, 54.4), 216 ($C_{12}H_{14}N_3O$, 15.3), 202 ($C_{11}H_{12}N_3O$, 3.6), 201 ($C_{11}H_{11}N_3O$, 7.3), 200 (4.9, 188 (1.8), 187 (1.5), 186 (1.2), 185 (1.3), 175 (4.0), 173 (1.1), 145 (3.1), 123 (18.2), 119 (6.7), 118 (3.1), 111 (3.9), 110 (2.1), 109 (3.4), 106 (5.7), 105 (6.2), 104 (13.4), 98 (12.7), 97 (21.4), 91 (9.6), 83 (49.9), 77 (23.8), 68 (10.1), 64 (22.3), 57 (22.7), 56 (100.0), 55 (13.2), 54 (11.9), 51 (10.7).

Das intakte Molekülradikalion konnte unter den Bedingungen der elektronenstoßinduzierten Ionisation nicht gefunden werden ($M^{+\cdot}$: m/z 333).

(+)-FAB: m/z (rel. Int.[%])= 230 (74.0), 217 (8.0), 56 (100.0); kein intaktes protoniertes Molekülion nachweisbar.

(-)-FAB: m/z (rel. Int[%])= 333 (M^-, 2.0), 310 ($[M - Na]^-$, 100.0), 214 (4.5), 191 (12.0), 150 (9.7).

Die (-)-FAB-Analyse gestattet den Nachweis des intakten Molekülanions!

12.9. Phenazon (1)

Die Verbindung wurde von Fa. Merck, Darmstadt (Nr. 7456) bezogen.

MS (100° C, 80 eV)

EI: m/z (rel. Int.[%])= 188 ($M^{+\cdot}$, 100.0), 173 (6.7), 159 (6.7), 115 (9.4), 105 (27.5), 96 (77.8), 93 (14.6), 91 (11.8), 82 (13.7), 77 (93.4), 56 (63.6), 51 (33.3).

Die CI-Analyse lieferte unter gleichen Bedingungen protonierte Molekülradikalionen bei m/z 189 mit einer relativen Intensität von 100.0 %.

12.10. Rubazonsäure (26) und Methylrubazonsäure (27)

Beide Verbindungen wurden von W. Hänsel, Pharmazeutisches Institut der Universität Kiel zur Verfügung gestellt*.

MS (140° C, 80 eV) - Rubazonsäure (26)

EI: m/z (rel. Int.[%])= 359 ($M^{+\cdot}$, 100.0), 342 (1.9), 331 (1.3), 314 (1.8), 226 (3.8), 179.5 (M^{2+}, 3.4), 132 (10.7), 91 (23.5), 77 (14.8).

MS (150° C, 80 eV) - Methylrubazonsäure (27)

EI: m/z (rel. Int.[%])= 373 ($M^{+\cdot}$, 100.0), 359 (4.2), 303 (6.5), 240 (15.7), 203 (10.5), 186.5 (M^{2+}, 3.6), 132 (13.4), 91 (23.8), 77 (12.5), 56 (35.1).

---

* Ich danke Herrn Prof. Dr. W. Hänsel für die Überlassung der Referenzsubstanzen.

ANHANG

Meßwerte der pharmakokinetischen Untersuchungen

A) Konzentration von Isopropylaminophenazon (5) in Plasma und Speichel nach p.o. Gabe von 870 mg 5 (≙ 1 g 5-HCl)

P L A S M A	
t [h]	Konz. [µg/ml]
0.25	2.6
0.50	6.9
0.75	8.8
1.00	10.8
1.50	15.0
2.00	16.5
2.50	15.6
3.00	12.6
4.00	9.2
6.00	5.8
8.00	4.7
12.00	1.6

S P E I C H E L	
t [h]	Konz.[µg/ml]
0.25	16.7
0.50	11.0
0.75	10.9
1.00	6.5
1.50	12.5
2.00	4.8
2.50	6.5
3.00	5.5
4.60	2.6
8.00	1.4

B) Ausscheidung mit dem Urin (Dosis und Applikation s. A))

Zeitraum [h]	Verbindung	Ausscheidung [% der Dosis]
0 - 12	Isopropylaminophenazon (5)	1.8
0 - 12	Hydroxyphenazon (8) (konjugiert)	10.5
0- 7	Acetylaminophenazon (7)	0.3
7- 14		0.3
14- 19		0.9
19- 31		0.2
31- 42		0.6
42- 55		0.1

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1) G. EISENBRAND, B. SPIELHALDER, J. KANN, R. KLEIN und R. PREUSSMANN, Arzneim.-Forsch., 29, 867 (1979).

2) Bundesgesundheitsamt: Sondersitzung gemäß § 63 AMG '76 zur Risiken/Nutzen-Abwägung bei der Anwendung von Arzneimitteln beim Menschen, die Metamizol, Propyphenazon, Phenazon oder Isopyrin enthalten Berlin, den 11. Juni 1981.

3) G. RICHARZ, W. SCHOETENSACK und M. VOGEL, Arzneim.-Forsch., 10, 676 (1960).

4) S. PFEIFER und O. MANNS, Pharmazie, 12, 401 (1957).

5) H. MAURER und K. PFLEGER, Fresenius Z. Anal. Chem., 314, 586 (1983).

6) 8. Verordnung zur Änderung der Verordnung über verschreibungspflichtige Arzneimittel Pharm. Ztg., 27, 1434 (1982).

7) K.-H. BEYER, Dt. Apoth. Ztg., 35, 1868 (1981).

8) H. BÄSSMANN und J. BÖTTCHER, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 311 (Suppl.), R 17 (1980).

9) S. PFEIFER, Biotransformation der Arzneimittel, 1. Aufl., S. 50 ff., S. 262 ff., S. 290 ff. (und dort zitierte Literatur), Verlag Chemie, Weinheim 1979.

10) DIPYRON - Eine Übersicht 1977, Hoechst AG, Frankfurt/M. 1977.

11) W. SCHOETENSACK, G. RICHARZ und P. BISCHLER, Arzneim.-Forsch., 10, 665 (1960).

12) TOMANOL®, DELTA-TOMANOL® Produktinformation, Byk-Gulden, Konstanz.

13) F. A. KUEHL, R. W. EGAN, E. A. HAM, G. C. BEVERIDGE und C. G. VAN ARMAN, Nature, 265, 170 (1977).

14) R. W. EGAN, J. PAXTON und F. A. KUEHL, J. Biol. Chem., 251, 7329 (1976).

15) R. J. FLOWER und J. R. VANE,
Biochem. Pharmacol., 23, 1439 (1974).

16) A. RAHIMTULA und P. J. O'BRIEN,
Biochem. Biophys. Res. Commun., 70, 893 (1976).

17) J. R. VANE,
Nature, New Biol., 231, 232 (1971).

18) K. SCHROER
Prostaglandine, 1. Aufl., S.77f., G. Thieme Verlag, Stuttgart 1984.

19) E. CADENAS, H. SIES, W. NASTAINCYZK und V. ULLRICH
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 364, 519 (1983).

20) H. J. DUCHSTEIN,
Arch. Pharm., 318, 127 (1985).

21) E. ZIETZ und G. SPITELLER,
Biomed. Mass Spectrom., 4, 155 (1977).

22) K. VOIGT,
Dissertation, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg 1964.

23) W. HÄNSEL und H. FRIEDMANN,
Dt. Apoth. Ztg., 123, 2143 (1983).

24) J. BÖTTCHER,
Dissertation, Technische Universität Braunschweig 1982.

25) F. W. RÖLLGEN,
Nachr. Chem. Tech. Lab., 31, 174 (1983).

26) M. BARBER, R. S. BORDOLI, G. J. ELLIOT, R. D. SEDGWICH und A. N. TYLER,
Anal. Chem., 54, 645 A (1982).

27) E. KLUG,
Arzneim.-Forsch., 20, 201 (1970).

28) M. VOLZ und H. M. KELLNER,
Br. J. Clin. Pharmac., 10, 299 S (1980).

29) E. KLUG,
persönliche Mitteilung.

30) F. PECHTHOLD,
Arzneim.-Forsch., 14, 474 (1964).

31) B. B. BRODIE und J. AXELROD,
J. Pharmac. Exp. Ther., 99, 171 (1950).

32) R. A. UPTON, J. N. BUSKIN, R. L. WILLIAM, M. G. HOLFORD und S. RIEGLEMANN,
J. Pharm. Sci., 69, 1254 (1980).

33) C. W. N. CHIANG und L. Z. BENET,
Pharmacology, 23, 326 (1981).

34) J. BÖTTCHER, H. BÄSSMANN und R. SCHÜPPEL,
J. Pharm. Pharmacol., 34, 168 (1982).

35) M. W. E. TEUNISSEN, J. E. MEERBURG-VAN DER TORREN, N. P. E. VERMEULEN und D. D. BREIMER,
J. Chromat., 278, 367 (1983).

36) M. DANHOF, E. DE GROOT-VAN DER VIS und D.D. BREIMER,
Pharmacology, 18, 210 (1979).

37) A. KARAKAYA und D. E. CARTER,
J. Chromat., 195, 431 (1980).

38) G. J. MULDER, J. A. HINSON und J. R. GILLETTE,
Biochem. Pharmacol., 26, 189 (1977).

39) C. L. MEHLTRETTER,
Advan. Carbohydr. Chem., 8, 231 (1953).

40) J. BÖTTCHER, H. BÄSSMANN, R. SCHÜPPEL und W. D. LEHMANN,
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 321, 226 (1982).

41) J. BREITER,
Arzneim.-Forsch., 28, 1941 (1978).

42) Y. NAGASE und K. SHIMADA,
J. Chromat., 181, 51 (1980).

43) J. B. HOUSTON und J. C. RHODES,
Brit. J. Pharmacol., 75, 59 P (1982).

44) J. MEIER, H. RETTIG und H. HESS,
Biopharmazie, 1. Aufl., Kap. 7 und 8, G. Thieme Verlag, Stuttgart 1981.

45) U. KLOTZ,
Klinische Pharmakokinetik, 1. Aufl., S. 29 f., G. Fischer Verlag, Stuttgart 1979.

46) A. WINDORFER, G. MÜLLER und C. STEHR,
Dtsch. Med. Wschr., 102, 1460 (1977).

47) R. WEISS, J. BRAUER, U. GOERZ und R. PETRY,
Arzneim.-Forsch., 24, 345 (1974).

48) G. ASMARDI und J. JAMALI,
J. Chromat., 272, 183 (1983).

49) H. S. FRASER, J. G. MUCKLOW, S. MURRAY und D. S. DAVIES,
Brit. J. Clin. Pharmac., 3, 321 (1976).

50) E. S. VESELL und J. G. PAGE,
Science, 161, 72 (1968).

51) L. FLEISCHMANN,
Pharm. Acta Helv., 48, 192 (1973).

52) B. N. LA DU, L. GAUDETTE, N. TROUSOF und B. B. BRODIE,
J. Biol. Chem., 214, 741 (1955).

53) K. ROTH und G. RUCH-ZASKE,
in Vorbereitung.

54) H. SCHWARZ,
Nachr. Chem. Tech. Lab., 29, 687 (1981).

55) Documenta Geigy - Wissenschaftliche Tabellen, 6. Aufl., S. 156, Fa. Geigy, Basel 1966.

56) H. L. BRADLOW,
Steroids, 11, 265 (1968).

57) R. V. SMITH und J. T. STEWART,
Textbook of Biopharmaceutic Analysis, 1. Ed., S. 32 ff., Lea&Febiger, Philadelphia (1981).

58) W. PSCHYREMBEL,
Klinisches Wörterbuch, 252. Aufl., S. 947, Walter de Gruyter Verlag, Berlin 1975.

59) M. GIBALDI, D. PERRIER
Pharmacokinetics, Drugs and the Therapeutical Sciencies, 1. Ed., Marcel Dekker Inc., New York 1975

60) K. SCHROER,
Prostaglandine, 1. Aufl., S. 47 ff., G. Thieme Verlag, Stuttgart 1984.

61) J. BAUMANN, F. v. BRUCHHAUSEN und G. WURM,
Arch. Pharm., 313, 330 (1980).

62) J. BAUMANN, F. v. BRUCHHAUSEN und G. WURM,
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 306, 85 (1979).

63) M. BOCKMÜHL,
Medizin und Chemie, Bd. 3, S. 303, Leverkusen 1936.

64) K. B. EIK-NES und E. C. HORNING,
Gas Phase Chromatography of Steroids, 1. Aufl., S. 81, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg 1968.

65) K. PSCHORR und L. KNORR,
Liebigs Ann. Chem., 293, 49 (1896).

66) L. KNORR,
Liebigs Ann. Chem., 238, 216 (1887).

67) H. SHIMENO und H. JOSHIMURA
Xenobiotica, 2, 461 (1972).

68) F. A. KUEHL,
Acta Rhumatol. Belg., 1, 179 (1977).

Am Ende der Arbeit möchte ich mich für die Unterstützung während der Anfertigung meiner Dissertation bedanken:

bei Detlef Grunow (Institut für Pharmazie der FU Berlin) für die technische Hilfe bei der Durchführung der GC- und HPLC-Analysen,

bei Dr. Klaus Roth (Institut für Organische Chemie der FU Berlin) für die Aufnahme und Hilfe bei der Interpretation der NMR-Spektren,

bei Ursula Ostwald (Institut für Organische Chemie der FU Berlin) für die Aufnahme von MS-Spektren und besonders bei Dr. Gerhard Holzmann (Institut für Organische Chemie der FU Berlin) für die Durchführung spezieller MS-Analysen und die Hilfe bei der Interpretation der Ergebnisse,

bei Dr. Hans-Jürgen Duchstein (Institut für Pharmazie der FU Berlin) für die Diskussionsanregungen zum Thema "Reaktive Sauerstoffspezies" und für die Durchsicht des Manuskriptes und

bei Dr. Michael Hildebrand (Hauptdepartment Pharmakokinetik der Schering AG, Berlin) für die stete Bereitschaft zu intensiven Diskussionen und für die Durchsicht des Manuskriptes.

LEBENSLAUF

24.12.1957	geboren in Berlin-Spandau
1964 - 1970	Birken-Grundschule in Berlin-Spandau
1970 - 1976	Freiherr-vom-Stein-Gymnasium in Berlin-Spandau
10.06.1976	Abitur
WS 1976 - WS 1980	Studium der Pharmazie an der Freien Universität Berlin
07.09.1978	1. Abschnitt der Pharmazeutischen Staatsprüfung
30.04.1980	2. Abschnitt der Pharmazeutischen Staatsprüfung
Juni 80 - Mai 81	Praktikum in der Carl-Schurz-Apotheke in Berlin-Spandau
01.06.1981	3. Abschnitt der Pharmazeutischen Staatsprüfung
14.07.1981	Approbation als Apotheker
Juni 81 - März 82	Tätigkeit als Apotheker in der Carl-Schurz-Apotheke in Berlin-Spandau
Aug. 81 - Dez. 81	Volontariat in der Abt. Toxikologie und gerichtliche Chemie der Landesanstalt für Lebensmittel-, Arzneimittel- und gerichtliche Chemie in Berlin-Tiergarten
WS 1981/82	Lehrauftrag am Fachbereich Pharmazie der Freien Universität Berlin
Aug. 1981	Erteilung des Themas für die Dissertation
01.02.1982	Beginn der praktischen Arbeiten
seit 01.04.1982	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin